

Patofizjologia posocznicy.

Część I. Rola peptydów przeciwdrobnoustrojowych jako ważnego elementu odporności wrodzonej

Magdalena Kalwas-Śliwińska

z Katedry Chorób Wewnętrznych Małych Zwierząt z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Znaczenie odporności wrodzonej w rozwoju posocznicy

Posocznicę definiuje się jako zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej – SIRS (systemic inflammatory response syndrome), czyli aktywację mechanizmów odporności wrodzonej w odpowiedzi na zakażenie (1). Wrodzona (nieswoista) odpowiedź immunologiczna ma za zadanie chronić organizm przed wniknięciem i rozprzestrzenieniem się patogenów. Oprócz naturalnych barier, takich jak powłoki ciała (z obecnymi na nich limfocytami T γ), w jej skład wchodzi przede wszystkim komórki fagocytyczne (makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne), mediatory zapalenia i układ dopełniacza (2, 3; **tab. 1**). Chociaż odporność wrodzoną postrzega się głównie w kontekście niebezpieczeństw związanych z wniknięciem drobnoustrojów do organizmu, warto pamiętać, że mogą ją uaktywnić również takie czynniki, jak: uszkodzenie mechaniczne tkanek, promieniowanie jonizujące, stres oksydacyjny, niedokrwienie czy działanie bardzo wysokich lub niskich temperatur (4). W ostatnich latach, naukowcy z dużym zainteresowaniem przyglądają się innemu z elementów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej – peptydom przeciwdrobnoustrojowym (antimicrobial peptides – AMPs, nazywanych też peptydami obronnymi gospodarza (host defense peptides – HDPs), wśród których wyróżnia się trzy podstawowe grupy:

- 1) enzymy oddziałujące na konkretne części mikroorganizmów, np. lizozym zdolny zniszczyć ścianę komórkową bakterii;
- 2) peptydy wiążące ważne mikroelementy, takie jak cynk lub żelazo, np. kalprotektyna i laktoferyna;
- 3) peptydy uszkodzające błony komórkowe mikroorganizmów, np. katelicydyny i defensyny (5, 6).

Znaczenie peptydów przeciwdrobnoustrojowych w patofizjologii posocznicy polega przede wszystkim na ich funkcji obronnej, ponieważ jako część mechanizmów wrodzonej odporności mają one za zadanie powstrzymać patogeny

przed wniknięciem do organizmu i ułatwić ewentualne zwalczenie zakażenia, a zatem zatrzymać rozwój sepsy na jej wstępnym etapie – miejscowej reakcji zapalnej. Pierwsza faza posocznicy rozgrywa się więc w obszarze zadziałania szkodliwego bodźca (7, 8, 9, 10). Zdrowy organizm dysponuje wieloma zróżnicowanymi mechanizmami tzw. pierwszej linii obrony, które nie pozwalają na przedostanie się szkodliwych drobnoustrojów do organizmu (11). Przykładowa analiza takich systemów zabezpieczeń w drogach oddechowych (najczęstsze miejsce rozprzestrzeniania się zakażenia w przypadku sepsy u kotów), pozwala zauważyć, że komórki nabłonka błony śluzowej cechują się ścisłymi połączeniami (tight junctions), a obecność rzęsek umożliwia usuwanie szkodliwych cząsteczek i nie dopuszcza ich do dolnych dróg oddechowych. Komórki nabłonka układu oddechowego, podobnie jak układów: pokarmowego, rozrodczego i moczowego, wytwarzają peptydy przeciwdrobnoustrojowe, takie jak: katelicydyny i defensyny, zdolne uszkadzać błonę komórkową bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jak również niszczyć: prątki, grzyby, pasożyty wewnątrzkomórkowe oraz wirusy (2, 5, 6).

Występowanie i mechanizm działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych na przykładzie katelicydyn i defensyn

Katelicydyny i defensyny to dwie najlepiej poznane klasy peptydów przeciwbakteryjnych, zarówno u człowieka, jak i innych ssaków. Produkowane są one nie tylko przez komórki układu odpornościowego

Tabela 1. Podstawowe mechanizmy odporności wrodzonej stanowiące pierwszą linię obrony przed wniknięciem drobnoustrojów i wstępnym etapem rozwoju posocznicy (2)

Podstawowe mechanizmy odporności wrodzonej
- Bariera błony śluzowej (ściśle połączenia komórek nabłonka)
- Klirens rzęskowo-śluzowy
- Defensyny
- Katelicydyny
- Układ dopełniacza
- Komórki fagocytyczne

Patophysiology of sepsis. Part I. The role of antimicrobial peptides as an important element of innate immunity

Kalwas-Śliwińska M., Department of Small Animal Internal Diseases with Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW.

Sepsis, the systemic inflammatory response to infection is an important problem in critically ill veterinary patients associated with serious complications and high mortality rate. The dynamic sepsis process starts with the establishment of infection and proliferation of infectious organisms in the infective nidus. Therefore, the first line of defense against invading pathogens, known as innate immunity plays a crucial role in combating and containing infection at the point of entry, preventing development of overwhelming systemic inflammatory response. Innate mechanisms such as recognition of invading bacteria through specific receptors (Toll-like receptors), antimicrobial peptides and cytokine release and complement activation signals danger to other systems and allows time for the T and B cells of the more finely tuned, antigen-specific, adaptive immune system to become effective. The first part of this article focuses on the role of antimicrobial peptides (ABPs) also known as host defense peptides (HDPs) in the pathogenesis of sepsis and its potential utility in treatment of septic patients.

Keywords: sepsis, innate immunity, antimicrobial peptides, host defense peptides.

(neutrofile, makrofagi), ale również przez płytki krwi, komórki nabłonka układów: oddechowego, moczowo-płciowego, pokarmowego, a także komórki wątroby, skóry i spojówki oka (6, 12). Są również obecne w wielu płynach jam ciała i wydzielinach (6, 13).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe podlegają ciągłej ekspresji (dotyczy to przede wszystkim α -defensyn obecnych w fagosomach) lub też ich produkcja pobudzana jest na skutek zadziałania bodźców, takich jak: zakażenie czy zapalenie (co z kolei dotyczy większości β -defensyn wydzielanych głównie przez komórki nabłonkowe; 13, 14, 15). Udowodniono, że lipopolisacharyd (LPS, endotoksyna), składnik błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii

Gram-ujemnych, jeden z najważniejszych czynników wyzwalających rozwój posocznicy, nasila wytwarzanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Podobnie mogą oddziaływać również cytokiny IL-1 β oraz TNF- α (6, 13).

Mechanizm działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych polega na dezintegracji błony komórkowej drobnoustrojów poprzez jej uszkodzenie i wytworzenie w niej porów. Większość błon komórkowych drobnoustrojów zbudowana jest z kwaśnych fosfolipidów, a zatem cechuje je powinowactwo do kationowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Oddziaływania elektrostatyczne kationowych peptydów i ujemnie naładowanych lipidów błony komórkowej drobnoustroju umożliwiają ściśle, równoległe przyleganie peptydów i zakotwiczenie się ich w błonie komórkowej drobnoustroju lub neutralizację ładunku elektrycznego błony. Po zakotwiczeniu peptydów przeciwdrobnoustrojowych następuje zmiana struktury drugo- i trzeciorzędowej peptydu, który zmienia swoją orientację na prostopadłą i zostaje wbudowany w dwuwarstwę lipidową, tworząc transmembranowe pory. W przypadku bakterii Gram-ujemnych peptyd może przemieszczać się przez błonę zewnętrzną, a po przejściu warstwy peptydoglikanu przenikać przez błonę cytoplazmatyczną do cytoplazmy komórki bakteryjnej (6, 12, 16). W uproszczeniu można powiedzieć, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe mają zdolność uszkodzenia praktycznie każdego mikroorganizmu, na zasadzie opisanego wyżej mechanizmu, jeśli posiada on pozbawioną cholesterolu, ujemnie naładowaną błonę komórkową (6). Co ciekawe, peptydy przeciwdrobnoustrojowe są też zdolne do niszczenia komórek podległych transformacji, w tym nowotworowej (6, 17, 18, 19). Mechanizm ich działania polega wówczas na indukcji apoptozy komórki poprzez nagromadzenie w niej reaktywnych form tlenu i upośledzenie czynności jej mitochondriów (19). Nam i wsp. (20) wykazali, że w surowicy ludzi z rakiem okrężnicy obserwuje się

wyraźnie podwyższony poziom defensyny α -6, co może wskazywać na to, że peptyd ten mógłby znaleźć zastosowanie jako wiarygodny marker diagnostyczny tej choroby. Opublikowane niedawno wyniki badań Li i wsp. (21) sugerują też potencjalną skuteczność defensyny- β w immunoterapii nowotworowej z uwagi na jej działanie chemotaktyczne, rolę w aktywacji komórek dendrytycznych i ograniczenie wzrostu guza nowotworowego.

Postrzeganie peptydów przeciwdrobnoustrojowych jedynie w świetle ich działania jako naturalnych antybiotyków jest więc dużym uproszczeniem. Peptydy te są bowiem w stanie inicjować nabyte mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, niektóre z defensyn i katelicydyn wykazują działanie opsonizacyjne (nasilają proces fagocytozy), wchodzą w interakcję z układem dopełniacza, powodują degranulację mastocytów i uwolnienie histaminy, indukują chemokiny i cytokiny w komórkach nabłonka i monocytach, działają chemotaktycznie na neutrofile, monocyty, komórki T, aktywują komórki dendrytyczne. Ponadto peptydy przeciwdrobnoustrojowe są w stanie wejść w interakcję z komórkami gospodarza, stymulując wzrost ekspresji produktów swoistych genów, wliczając w to swoiste chemokiny, receptory chemokin, integryny i czynniki transkrypcyjne (6, 12, 22).

U psów aktywność przeciwdrobnoustrojową peptydów katelicydyny (K9CATH) oraz defensyn β (cBDs) udało się wykazać *in vitro* względem takich patogenów, jak: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudointermedius* (zarówno wrażliwy, jak i niewrażliwy na metycylinę) czy *Candida albicans* (6, 16, 23; **tab. 2**). Oznacza to, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą być potencjalnie przydatne w leczeniu zakażeń dróg moczowych, skóry, układu oddechowego, ośrodkowego układu nerwowego czy przewodu pokarmowego u tego gatunku zwierząt.

U ludzi udowodniono nie tylko aktywność przeciwdrobnoustrojową wielu peptydów przeciwdrobnoustrojowych,

zrobiono kolejny krok i dowiedziono zależności przyczynowo-skutkowej pomiędzy brakiem lub upośledzeniem ekspresji tych peptydów a występowaniem konkretnych jednostek chorobowych. Wykazano na przykład zależność między redukcją α -defensyn w komórkach Panetha a występowaniem nieswoistego, przewlekłego owrzodzenia przewodu pokarmowego, nazywanego chorobą Leśniowskiego-Crohna (24, 25). Udało się również dowieść korelacji pomiędzy występowaniem atopowego zapalenia skóry przebiegającego z upośledzeniem ekspresji katelicydyn a częstszym występowaniem infekcji bakteryjnych (12, 15). Na podstawie tych informacji można przypuszczać, że niedobór lub upośledzona ekspresja peptydów przeciwdrobnoustrojowych również u małych zwierząt może stanowić potencjalną przyczynę zwiększonej zapadalności na konkretne choroby, a także predysponować do wtórnych zakażeń bakteryjnych. Wiadomo, że u myszy, u których ograniczono produkcję defensyn β przez komórki dendrytyczne, zwiększyła się podatność na zakażenie *Pseudomonas aeruginosa* (26).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe a pacjent z posocznicą

Zaburzenia dotyczące peptydów przeciwdrobnoustrojowych rozumiane jako „wyłamanie w pierwszej linii obrony”, która w prawidłowych warunkach chroni organizm przed wniknięciem czynnika zakaźnego do organizmu i pomaga zwalczyć zakażenie, mogą odgrywać kluczową rolę w predyspozycji do rozwoju posocznicy. W świetle nowych badań widać wyraźnie, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe są niezwykle istotnym elementem odporności wrodzonej. W kontekście sepsy niewątpliwie ważna jest informacja o tym, że niektóre peptydy przeciwdrobnoustrojowe neutralizują lipopolisacharyd uwalniany podczas lizy komórki bakterii Gram-ujemnych (27). Chen i wsp. (28) udowodnili, że również peptydy syntetyczne, otrzymane z jednego z takich

Tabela 2. Klinicznie istotne peptydy obronne u psów oraz ich aktywność przeciwko wybranym drobnoustrojom (6, 16, 23)

Peptydy	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa	Przykłady chorób mogących przebiegać z obecnością wymienionych patogenów
Defensyna β - cBDs katelicydyna - bK9CATH	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Candida albicans</i>	zakażenie dróg moczowych
	<i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>S. Typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i>	zapalenie żołądka i jelit
	<i>Staphylococcus aureus</i>	zapalenie skóry
	<i>Listeria monocytogenes</i>	zapalenie opon mózgowych, poronienia
	<i>Malassezia pachydermatis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , - <i>Staphylococcus pseudointermedius</i> wrażliwy i oporny na metycylinę	zapalenie skóry
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	zapalenie płuc

peptydów o nazwie granulizyna, są w stanie wykazywać takie działanie. Jeśli udaje się zneutralizować lipopolisacharyd, jeden z ważniejszych czynników wyzwalających posocznicy wywołaną przez bakterie Gram-ujemne zarówno u ludzi, jak i u małych zwierząt (29, 30, 31) przy pomocy syntetycznych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, należy uznać, że istnieją szanse ich zastosowania w leczeniu wstrząsu septycznego. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są też w stanie inaktywować takie toksyny bakteryjne, jak toksyna wytwarzana przez *Bacillus anthracis* (32) oraz *Clostridium difficile* (jedynie toksyna B; 33). Według opublikowanego niedawno doniesienia (Nuding i wsp., 2014) wybrane peptydy przeciwdrobnoustrojowe wzmacniają działanie antybiotyków przeciwko *Clostridium difficile* w warunkach *in vitro* niezależnie od ich mechanizmów działania. W doświadczeniu stosowano tigeicylinę, moksyflokacynę, piperacylinę/tazobaktam i meropenem pojedynczo lub w terapii łączonej. Ocena żywotności 20 różnych szczepów *C. difficile* wykonana przy użyciu cytometru przepływowego i produkcji toksyn w teście ELISA wykazała, że połączenie antybiotyków z peptydami przeciwdrobnoustrojowymi może być nową, skuteczniejszą metodą leczenia zakażeń *C. difficile*. Prawdopodobnym wytłumaczeniem jest to, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe, uszkadzając ścianę bakterii i doprowadzając do wytworzenia w niej porów, mogą zwiększać pobieranie antybiotyków przez komórki bakteryjne (34). Zważywszy na to, że bakterie beztlenowe izolowane są z krwi u 8,8% psów oraz 15% kotów z posocznicy (35), opisana formuła leczenia mogłaby być w przyszłości stosowana do leczenia pacjentów z sepsą. Z kolei doniesienie Cho i wsp. (19) o tym, że nawet te peptydy, których pierwotne działanie polega na uszkodzeniu ściany czynników zakaźnych, mogą wykazywać odmienny mechanizm działania, to jest indukować apoptozę komórek (np. drożdży lub komórek nowotworowych), może wskazywać na jeszcze inną możliwość ich zastosowania – jako antybiotyków w przypadku patogenów opornych na działanie uszkadzające.

Narastający problem antybiotykooporności, przyczyniający się niewątpliwie do wysokiej śmiertelności pacjentów z posocznicy, wymusza poszukiwanie nowych rozwiązań. Opublikowane dotychczas odkrycia dotyczące mechanizmów i skuteczności działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych pozwalają wierzyć, że cząsteczki te otwierają kolejną, ciekawą ścieżkę w badaniach nad wprowadzeniem alternatywnych do antybiotykoterapii (bądź ją uzupełniających) metod

leczenia zakażeń, posocznicy i wstrząsu septycznego.

Piśmiennictwo

- Kirby R.: Patophysiology of systemic inflammatory response syndromes: septic shock. *Proceedings of 11th International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium (IVECCS)*, 2004, 467–469.
- Sriskandan S., Altman D.M.: The immunology of sepsis. *J. Pathol.* 2008, **214**, 211–223.
- Day M.: *Immunologia kliniczna psów i kotów*. Galaktyka 2011, s. 11–60.
- Matzinger P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994, **12**, 991–1044.
- Lewis D.H., Chan D.L., Pinheiro D., Armitage-Chan E., Garden O.A.: The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory T-cells. *J Vet Intern Med* 2012, **26**, 457–482.
- Linde A., Ross C.R., Davis E.G., Dib L., Blecha F., Melgarejo T.: Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. *J Vet Intern Med* 2008, **22**, 247–265.
- Bone R. C., Grodzin C. J., Balk R. A.: Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997, **112**, 235–243.
- Bielecki K., Kiciak A.: Powikłania septyczne mnogich obrażeń ciała. *Zakażenia* 2004, **1**, 198–204.
- Balk R.: Roger C. Bone, MD and the evolving paradigms of sepsis. *Contrib Microbiol.* 2011, **17**, 1–11.
- Stuart F.W., Jones D.E.: Mechanisms of innate immunity in sepsis. W: *Sepsis* (ed. Baudouin S.V.), Springer, 2008, s. 5–10.
- Tizard I.: *Veterinary Immunology*. Elsevier, 2013, s. 283–295.
- Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Defensyny i katelicydyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. *Postępy Hig Med. Dośw.* 2008, **62**, 694–707.
- Sima P., Trebichavsky I., Sigler K.: Mammalian antibiotic peptides. *Folia Microbiol* (Praha) 2003, **48**, 123–137.
- Diamond G., Kaiser V., Rhodes J., Russell J.P., Bevins C.L.: Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun.* 2000, **68**, 113–119.
- Boman H.G.: Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 2003, **254**, 197–215.
- Santoro D., Maddox D.: Canine antimicrobial peptides are effective against resistant bacteria and yeasts. *Vet Dermatol* 2014, **25**, 35–39.
- Yang D., Biragyn A., Kwak L.W., Oppenheim J.J.: Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 2002, **23**, 291–296.
- Oppenheim J.J., Biragyn A., Kwak L.W., Yang D.: Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis.* 2003, **62**, 17–21.
- Cho J., Hwang I.S., Choi H., Hwang J.H., Hwang J.S., Lee D.G.: The novel biological action of antimicrobial peptides via apoptosis induction. *J Microbiol Biotechnol.* 2012, **22**, 1457–1466.
- Nam M.J., Kee M.K., Kuick R., Hanash S.M.: Identification of defensin alpha-6 as a potential biomarker colon adenocarcinoma. *J Biol. Chem.* 2005, **280**, 8260–8265.
- Li D., Wang W., Shi H.S., Fu Y.J., Chen X., Chen X.C., Liu Y.T., Kan B., Wang Y.S.: Gene therapy with beta-defensin 2 induces antitumor immunity and enhances local antitumor effects. *Hum Gene Ther* 2014, **25**, 63–72.
- Durr M., Peschel A.: Chemokines meet defensins: the merging concept of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect. Immun.* 2002, **70**, 6515–6517.
- Erls K., Brownlie J.: Expression of beta-defensins in the canine respiratory tract and antimicrobial activity against *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010, **135**, 12–19.
- Wehkamp J., Salzman N.H., Porter E., Nuding S., Weichenthal M., Petras R.E., Shen B., Schaeffeler E., Schwab M., Lintzeier R., Feathers R.W., Chu H., Lima H., Fellermann K., Ganz T., Stange E.F., Bevins C.L.: Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, **102**, 18129–18134.
- Wehkamp J., Schmid M., Fellermann K., Stange E.F.: Defensin deficiency, intestinal microbes, and clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc. Biol.*, 2005, **77**, 460–465.
- Kawasaki T., Kawasaki C., Sata T., Kobayashi M., Suzuki F.: Depressed production of beta-defensins from mouse splenic dendritic cells following thermal injury and its influence on susceptibility to infection. *J Anesth.* 2014, **6** (Epub ahead of print)
- Andra J., Gutschmann T., Garidel P., Brandenburg K.: Mechanisms of endotoxin neutralization by synthetic cationic compounds. *J. Endotoxin. Res.* 2006, **12**, 261–277.
- Chen X., Howe J., Andra J., Rossle M., Richter W., da Silva A.P., Krensky A.M., Clayberger C., Brandenburg K.: Biophysical analysis of interaction of granulysin-derived peptides with enterobacterial endotoxins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, **1768**, 2421–2431.
- Kübler A., Jaeschke R., Jankowski M.: Sepsa i wstrząs septyczny. W: *Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na rok 2011* (pod red. A. Szczeklika), Medycyna Praktyczna 2011, 2250–2255.
- Kruth S.: Endotoksemia. W: *Choroby zakaźne psów i kotów* (pod red. Green C.), Galaktyka 2010, s. 263–271.
- Martin G.: Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012, **10**, 701–706.
- Kim C., Gajendran N., Mitrucker H.W., Weiwad M., Song Y.H., Hurwitz R., Wilmanns M., Fischer G., Kaufmann S.H.: Human alpha defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005, **102**, 4830–4835.
- Giesemann T., Guttenberg G., Aktories K.: Human alpha-defensins inhibit *Clostridium difficile* toxin B: Human alpha-defensins inhibit *Clostridium difficile* toxin B. *Gastroenterology* 2008, **135**, 2049–2058.
- Nuding S., Frasch T., Schaller M., Stange E.F., Zabel L.T.: Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, **14** (Epub ahead of print)
- Kalwas-Śliwińska M.: Posocznica u ludzi, psów i kotów – etiologia i epidemiologia. *Zycie Wet.* 2014, **89**, 572–577.

Dr Magdalena Kalwas-Śliwińska,
e-mail: magdalena_kalwas@sggw.pl