

Received: 2009.09.10
Accepted: 2009.10.15
Published: 2009.11.12

Substancje wydzielane przez gruczoły skórne płazów jako nowe źródło antybiotyków i związków biologicznie czynnych

Amphibian skin secretions as a new source of antibiotics and biologically active substances

Ireneusz Całkosiński¹, Arkadiusz Zasadowski³,
Agnieszka Bronowicka-Szydełko¹, Katarzyna Dzierżba¹,
Ewa Seweryn¹, Maciej Dobrzyński⁴, Andrzej Gamian^{1,2}

¹ Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

² Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

³ Katedra Patologii i Farmakologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

⁴ Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Dotychczas głównym źródłem substancji aktywnych biologicznie wykorzystywanych w leczeniu są rośliny, pleśnie i kit pszczele, który zawiera propolis. Wyizolowane związki często same wykazują właściwości terapeutyczne, bądź też wymagają dodatkowych modyfikacji. W celu spotęgowania działania terapeutycznego, łączy się je z innymi związkami o działaniu farmakologicznym. Ostatnio zaobserwowano zjawisko obniżenia skuteczności działania wielu leków. Nadmierne stosowanie antybiotyków podczas leczenia infekcji u ludzi (zwłaszcza w szpitalach), a także często nieuzasadnione, szerokie używanie ich w leczeniu i w profilaktyce chorób zwierząt hodowlanych przyczynia się do wykształcania przez mikroorganizmy rozmaitych mechanizmów odpornościowych. Ze względu na zwiększającą się nieskuteczność stosowanych dotychczas antybiotyków oraz z powodu trudności w pozyskiwaniu nowych farmaceutyków konieczne jest prowadzenie poszukiwań nowych źródeł tych związków m.in. w organizmach zwierzęcych.

Badania dowodzą, że skóra płazów bogata jest w różnorodne substancje czynne o silnym działaniu farmakologicznym. Są nimi m.in.: toksyny, peptydy antymikrobiologiczne, peptydy opioidowe, steroidy oraz alkaloidy. Dowiedziono, że związki te wykazują działanie cytotoksyczne, anty-drobnoustrojowe, przeciwwirusowe (m.in. terapia anty-HIV), przeciwbólowe i przeciwzapalne. Mogą być one również stosowane w badaniach receptorów komórkowych i w analizie transbłonowego transportu jonów. Ponieważ związki te są wydzielane przez gruczoły skórne, można je w łatwy sposób pozyskiwać bez uszkodzania organizmów tych zwierząt. Być może więc skóra płazów stanowi potencjalne źródło nowych farmaceutyków.

Słowa kluczowe:

toksyny • peptydy antymikrobiologiczne • peptydy opioidowe • alkaloidy • steroidy • aminy biogenne • wydzieliny skóry płazów

Summary

So far, the main sources of biologically active substances used in medicine have been plants, molds, and propolis. The obtained compounds have either therapeutic features or require additional

modification. They are sometimes combined with other pharmacological substances to intensify their therapeutic effect. However, the effectiveness of many drugs has been rapidly decreasing. The overuse of antibiotics in the treatment and prophylaxis of human infections (especially in hospitals) as well as their widespread and often unjustified use in the treatment and prophylaxis of farm animal illnesses contribute to the development of a variety of resistance mechanisms by microorganisms. Because of the increasing ineffectiveness of antibiotics used so far and difficulties in obtaining new drugs, it is necessary to find new sources of these compounds, for example in animal organisms. Research has demonstrated that amphibian skin secretions are rich in a variety of active substances which have strong pharmacological properties. In these compounds we can distinguish, for example, toxins, antimicrobial peptides, opioid peptides, steroids, and alkaloids. These compounds show cytotoxic, antimicrobial, analgesic, anti-inflammatory, and even antiviral activities (including anti-HIV). These substances can be used in cell receptor studies and in transmembrane ion transport analysis. Because these compounds are secreted by skin glands, they can be easily obtained without injuring these animals. It is probable that amphibian skin constitutes a potential source of modern drugs.

Key words: toxins • antimicrobial peptides • opioid peptides • alkaloids • steroids • biogenic amines • amphibian skin secretions

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=898119>

Word count: 4558

Tables: 1

Figures: 11

References: 73

Adres autora: dr hab. Ireneusz Całkosiński, Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej AM, ul. T. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław; e-mail: i.calcosinski@wp.pl

Wykaz skrótów: **cRW2** – cykliczny heksapeptyd (RRWWFR) przeciwdrobnoustrojowy; **HBD3** – ludzka beta-defensyna 1; **LL-37** – ludzka katelicydyna LL-37; **MIC** – minimalne stężenie inhibitora; **NMR** – spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego; ΔG_{mix} – zmiana energii swobodnej spowodowana mieszaniami składników A i B.

PODSTAWOWE FUNKCJE SKÓRY PŁAZÓW

Pod względem morfologicznym, biochemicznym i fizjologicznym skóra płazów to organ pełniący różnorodne funkcje. Umożliwia ona nie tylko wymianę gazową, regulację ilości wody w organizmie, ale także dzięki zdolności do wydzielania różnych toksyn i jadów, chroni przed wszelkiego rodzaju zagrożeniami. Mechanizm reakcji wyzwalanych w skórze płaza pod wpływem czynników biologicznych i chemicznych przedstawiono na ryc. 1.

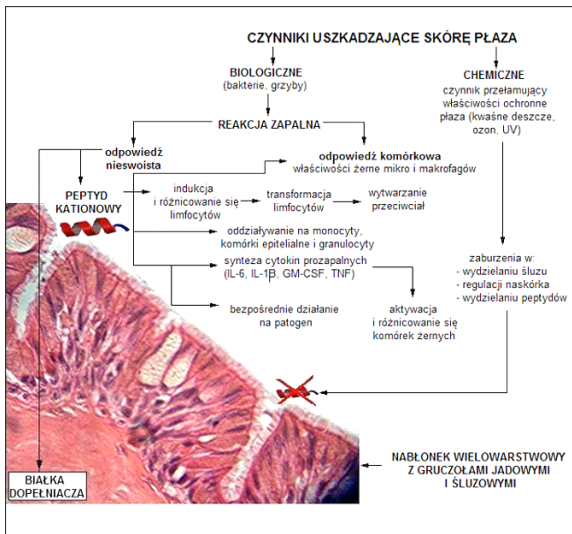
Narząd ten odgrywa również istotną rolę w zachowaniach reprodukcyjnych (dymorfizm płciowy przejawiający się różną kolorystyką skóry, czy wydzielanie substancji wpływających na różne zachowania godowe). Ponadto wiadomo, że po przekształceniu skóry i rozbudowie gruczołów może ona brać udział w inkubacji jaj. Skóra umożliwia też wykształcenie strategii kamuflażu przez zmiany kolorystyki i tekstury, czy przez wytwarzanie skórnych przydatków. Funkcje pełnione przez skórę tych zwierząt, są więc ze sobą powiązane i doskonale współgrają ze sobą.

Skóra płazów jest względnie naga i dobrze przepuszczalna. Dlatego też zwierzęta te nie są zdolne do tolerancji bardzo nagłych i gwałtownych zmian środowiskowych, spowodowanych np.: niespodziewanymi ubytkami wody, dużą ilością

zanieczyszczeń, czy występowaniem kwaśnych deszczy. Ponadto stosowanie chemikaliów w celu np. uzdatniania wody (ozon, chlor) oraz pestycydów (herbicydy, fungicydy), a także obecność licznych drobnoustrojów powoduje, że skóra płazów jest stale narażona na rozmaite uszkodzenia. Choć czynniki te indukują odpowiedź immunologiczną w skórze płaza, to w wielu przypadkach kumulacja ksenobiotyków może prowadzić do występowania różnych schorzeń. Zakłócenia funkcji wydzielniczych skóry, której następstwem jest zmiana składu śluzu prowadzi zwykle do rozwoju infekcji bakteryjnych i grzybiczych [15,43].

CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI CHEMICZNYCH WYDZIELANYCH PRZEZ GRUCZOŁY SKÓRNE U PŁAZÓW

Wydzieliny wytwarzane przez gruczoły ziarniste płazów mogą zawierać m.in.: aminy biogenne, bufogeniny i bufotoksyny (steroidy), alkaloidy oraz peptydy, a także niescharakteryzowane dotąd zetekitoksyny, wyizolowane z wydzielin skórnych żab z rodzaju *Atelopus*, zamieszkujących środkowo-południową Amerykę [43]. Związki te mogą wywoływać: kardiotoxycytność, miotoksycytność, neurotoksycytność, cholinemimetyczność, sympatomimetyczność. Mogą również mieć działanie znieczulające, a także powodować zwężanie naczyń krwionośnych lub obniżać ciśnienie krwi. Znane jest również ich działanie halucynogenne,



Ryc. 1. Mechanizm wydzielania substancji aktywnych biologicznie przez skórę płaza na przykładzie kationowego peptydu antymikrobiologicznego. Czynniki pochodzenia biologicznego (bakterie, grzyby) powodują reakcję zapalną, która indukuje dwa typy odpowiedzi – nieswoistą i komórkową. Odpowiedź nieswoista jest związana zarówno z syntezą białek dopełniacza, jak i z wydzielaniem peptydów kationowych przez gruczoły jadowe znajdujące się w skórze płaza. Związki te mogą indukować tworzenie się i różnicowanie limfocytów, co w konsekwencji prowadzi do wytwarzania przeciwciał lub też oddziaływać na monocyty, komórki epitelialne, czy granulocyty. Peptydy kationowe mogą również indukować odpowiedź komórkową, a także aktywować komórki żerne bądź też mogą bezpośrednio działać na patogen. Wydzielanie peptydów kationowych może być zahamowane na skutek działania czynników chemicznych, takich jak promienie UV, chlor (np. rozpuszczony w wodzie), czy kwaśne deszcze, które zawierają m.in. siarczany

hemolityczne, cytotoksyczne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, czy nawet przeciwnowotworowe [22,40,43,57].

Badania wydzielin gruczołów skórnych u płazów podejmowane są z trzech powodów. Po pierwsze, są one wykorzystywane do badań biofizycznych. Po drugie, ich pozyskiwanie umożliwia tworzenie biochemicznej taksonomii niezbędnej do określania powiązań międzygatunkowych tych organizmów. Po trzecie, wydzieliny te mogą być źródłem nowych farmaceutyków. Pewne alkaloidy wyizolowane z wydzielin wytwarzanych przez płazy z rodziny drzewołazów (*Dendrobatiidae*), takie jak batrachotoksyny, histronikotoksyny, pumiliotoksyny mogą służyć do badań receptorów komórkowych oraz kanałów jonowych w błonach komórkowych. Związki te wykazują szerokie zastosowanie w biofizyce, neurofizjologii, farmakologii i chemii organicznej [15, 22, 40].

Skóra płazów z rodzaju *Phyllomedusa* wydzielają dermorfiny – heptapeptydowe opioidy, wykazujące silne działanie przeciwbólowe. Związki te nie tylko są stosowane w strategii obronnej przeciwko drapieżnikom, indukując u nich działanie nasenne, ale mogą również brać udział w uśmierzaniu bólu spowodowanego obrażeniami [15]. Innym alkaloidem, działającym silnie przeciwbólowo i znieczulająco, jest epibatydyna.

Skóra płazów zabezpiecza także te organizmy przed infekcjami bakteryjnymi. Związki antymikrobiologiczne mogą więc służyć do produkcji farmaceutyków chroniących skórę przed drobnoustrojami oraz do pozyskiwania leków stosowanych podczas infekcji bakteryjnych i grzybiczych. Używane obecnie podczas operacji (przede wszystkim w czasie transplantacji organów) środki immunosupresyjne działają nie tylko antydnoustrojowo, ale także upośledzają układ immunologiczny. Grzybice skóry występujące zwłaszcza w rejonach tropikalnych, mogą prowadzić do poważnych, ogólnoustrojowych infekcji. Problem ten potęguje dodatkowo wzrost oporności mikroorganizmów na obecnie stosowane leki przeciwgrzybicze. Jest bardzo prawdopodobne, że substancje chemiczne pozyskiwane z wydzielin skóry płazów, mogą się stać w przyszłości alternatywnymi lekami. Być może peptydy wydzielane przez skórę płazów można będzie stosować w szczepionkach przeciwwirusowych (włącznie ze szczepionką anty-HIV) [71]. Związki chemiczne wydzielane przez gruczoły płazów mogą być dodatkowo modyfikowane przez ich mikroflorę skórną, co może się przyczyniać do wzrostu ich aktywności antybiotycznej.

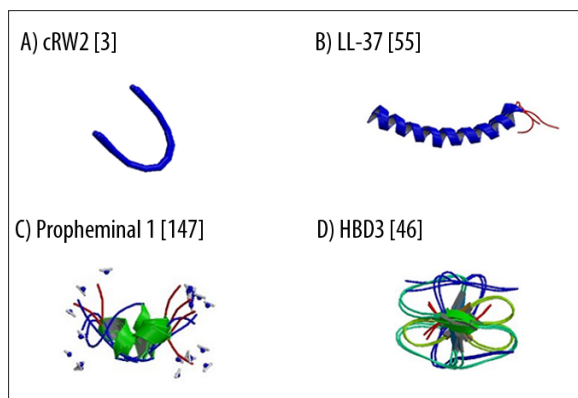
Ponadto u 12 gatunków płazów w wydzielinie skórnej odkryto również związki o właściwościach bioadhezyjnych. Dzięki swojej lepkości substancje te nie tylko służą do obrony przeciwko drapieżnikom, ale także nadają skórze wytrzymałość na rozciąganie. Związki te mogłyby być stosowane w chirurgii plastycznej jako składniki biokompatybilnych klejów, a także mogłyby być wykorzystywane do produkcji farmaceutyków przyspieszających procesy gojenia się ran.

PEPTYDY ANTYMIKROBIOLOGICZNE

Peptydy antymikrobiologiczne występują zarówno u bezkręgowców [11] jak i u kręgowców [1, 8]. Zawierają 15–45 reszt aminokwasowych i są zazwyczaj cząsteczkami o ładunku dodatnim [10]. Są bogate w reszty lizylowe i arginylowe oraz w reszty aminokwasów hydrofobowych. Cząsteczki te chętnie więc wiążą się do ujemnie naładowanych zewnętrznych organelli komórkowych bakterii, lipopolisacharydów, czy kwaśnych polisacharydów bakterii Gram-dodatnich [8]. Peptydy antymikrobiologiczne destabilizują błonę komórkową, co prowadzi do lizy komórki bakteryjnej. Poznano już ponad 800 sekwencji aminokwasowych peptydów antydnoustrojowych. Wiadomo również, że cząsteczki te występują zarówno w organizmach zwierzęcych, jak i roślinnych. Przypuszcza się, że każdy organizm ma 15–40 genów, kodujących te peptydy [10]. Ekspresja ich zachodzi w monocytach/makrofagach, neutrofilach, keratynocytach, a także w komórkach epitelialnych i w komórkach tucznych. Peptydy te są syntetyzowane w postaci propeptydów, które ulegają aktywacji w procesie proteolizy. Niektóre z nich są wydzielane w sposób ciągły, inne z kolei w wyniku indukcji wywołanej przez czynniki mikrobiologiczne, chemiczne, stany zapalne oraz mechaniczne uszkodzenia tkanki [47].

Na podstawie badań, podzielono peptydy antymikrobiologiczne na cztery podstawowe podgrupy:

- anionowe peptydy antymikrobiologiczne,
- kationowe peptydy antymikrobiologiczne,
- kationowe peptydy antymikrobiologiczne wzbogacone o specyficzne reszty aminokwasowe,



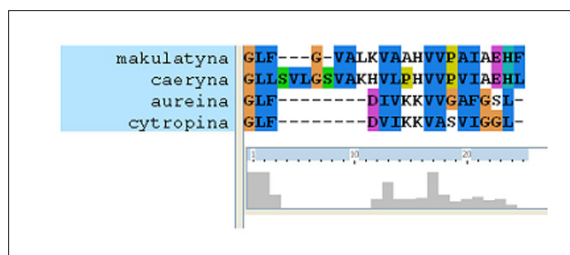
Ryc. 2. Struktury wybranych peptydów należących do czterech podgrup: a) cRW2 (PDB: 2ox2) - I podgrupa; b) LL-37 (PDB: 2k6o) - II podgrupa; c) Prophenina 1 (PDB: 2i1e) - III podgrupa; d) HBD3 (PDB: 1kj5) - IV podgrupa

- peptydy antymikrobiologiczne zawierające reszty cysteinyłowe [13].

Anionowe peptydy antymikrobiologiczne są małymi cząsteczkami, o masie 721,6–823,8 [Da], występującymi w płynie opłukującym pęcherzyki oskrzelowe i w komórkach nabłonka. Wydzielane są w milimolarnych stężeniach i do aktywacji wymagają cynku jako kofaktora. Są bogate w reszty glutaminianylowe i asparaginyłowe. Drugą podgrupę stanowi ponad 290 kationowych peptydów antymikrobiologicznych. W swojej sekwencji zawierają one mniej niż 40 reszt aminokwasowych. Charakteryzuje je brak reszt cysteinyłowych. W roztworach wodnych mają strukturę nieuporządkowaną, natomiast w obecności miceli siarczuanu dodecylu sodu lub trifluoroetanolu, liposomów, pęcherzyków fosfolipidowych ulegają konwersji do struktury α -helisy. Peptydy należące do tej podgrupy wykazują większą aktywność antydebroustrojącą niż peptydy z pierwszej podgrupy. Trzecią podgrupę stanowi około 44 kationowych peptydów antymikrobiologicznych. Są one cząsteczkami bogatymi w takie aminokwasy jak prolina, arginina, fenyloalanina i tryptofan. Podobnie jak peptydy należące do drugiej podgrupy charakteryzuje je również brak reszt cysteinyłowych w sekwencji aminokwasowej. Niektóre z nich mogą mieć strukturę helikalną. Do czwartej podgrupy należy około 380 kationowych i anionowych peptydów antymikrobiologicznych. W swojej sekwencji aminokwasowej zawierają one reszty cysteinyłowe, są więc zdolne do tworzenia mostków disiarczkowych. Często też tworzą β -struktury [71]. Wymienione wyżej struktury peptydów antymikrobiologicznych należących do czterech kategorii przedstawiono na ryc. 2.

PEPTYDY ANTYMIKROBIOLOGICZNE PŁAZÓW

W zależności od gatunku skóra płaza może wydzielać 10–20 rodzajów peptydów antymikrobiologicznych, różniących się sekwencją aminokwasów, strukturą trójwymiarową i zakresem działania [50]. Peptydy należące do 4 głównych grup peptydów antymikrobiologicznych: aurein, makulatyn, caeryn i cytropin, mają na N końcu łańcucha peptydowego identyczne trzy reszty aminokwasowe: Gly – Leu – Phe (ryc.3). Natomiast na C końcu zawierają



Ryc. 3. Porównanie sekwencji aminokwasowych czterech peptydów antymikrobiologicznych: makulatyna 1.1, caeryna 1.1, aureina 1.2, cytropina 1.1 za pomocą programu Clustal X

resztę lizynyłową oprócz makulatyny, która zawiera resztę fenyloalaninyłową [36].

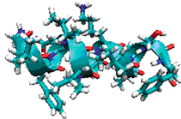
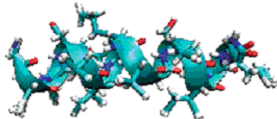
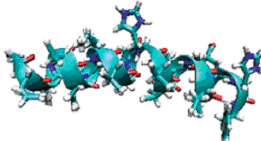
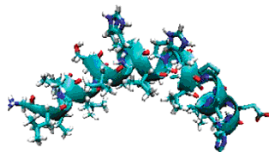
Peptydy antymikrobiologiczne wiążą się do ujemnie naładowanych struktur błony komórkowej i po osiągnięciu optymalnego stężenia, przekraczają barierę dwuwarstwy [2,50]. Powodują one zaburzenie gradientu elektrochemicznego błony komórkowej, co w konsekwencji prowadzi do lizy komórki patogenu. Proces ten może przebiegać za pośrednictwem jednego z dwóch mechanizmów. Pierwszy, tak zwany mechanizm „toczącej się beczki” polega na tworzeniu transbłonowego kanału, powstającego na skutek agregacji peptydów [46]. Badania przeprowadzone za pomocą mikroskopii konfokalnej wykazały, że w ten sposób oddziałuje z błoną komórkową makulatyna i jej zmutowane postaci [58]. Drugi mechanizm, to tzw. mechanizm „dywanowy”, który polega na odkładaniu się warstwy peptydów na powierzchni błony komórkowej. Tak powstały „dywan” uniemożliwia prawidłowe upakowywanie się lipidów [46]. W wyżej wymieniony sposób dwuwarstwą lipidową przekraczają: cytropina 1.1, aureiny 1.2 i 2.5 [27].

Peptydy antymikrobiologiczne płazów są syntetyzowane w warunkach stresowych dla organizmu. Powodują one lizę komórek patogenu, chroniąc w ten sposób płaza przed infekcją mikrobiologiczną. Wydzielane są w postaci nieaktywnego prepeptydu, składającego się z sekwencji sygnałowej, oddzielającej i właściwej sekwencji antymikrobiologicznej. Zarówno ich aktywacja, jak i dezaktywacja odbywa się z udziałem endopeptydaz. Na powierzchnię skóry płaza wydzielana jest tylko aktywna sekwencja antymikrobiologiczna, która oddziałując z błoną komórkową mikroorganizmu, niszczy ją [9].

Po upływie około 15–30 min od początku sekrecji (w zależności od gatunku płaza) peptydy są degradowane przez endopeptydazy błonowe, które usuwają reszty aminokwasowe z N końca peptydu [9]. Aureiny, cytropiny i makulatyny stanowią trzy odrębne rodziny peptydów. Poza nieznacznymi różnicami w składzie aminokwasowym peptydy te wykazują podobieństwo strukturalne (tabela 1) i funkcjonalne [3,10,58].

Na N końcu każdego z nich znajdują się następujące aminokwasy: **GLF**. Oprócz tego w sekwencji każdego z peptydów w pozycji siódmej i ósmej od N końca znajdują się kationowe reszty aminokwasowe. Najprawdopodobniej to właśnie ich obecność nadaje peptydom aktywność antybiotyczną. W środowisku wodnym peptydy antymikrobiologiczne mają strukturę nieuporządkowaną, natomiast

Tabela 1. Struktury wybranych peptydów antymikrobiologicznych otrzymanych dzięki uprzejmości dra J.D. Gehmana [34]

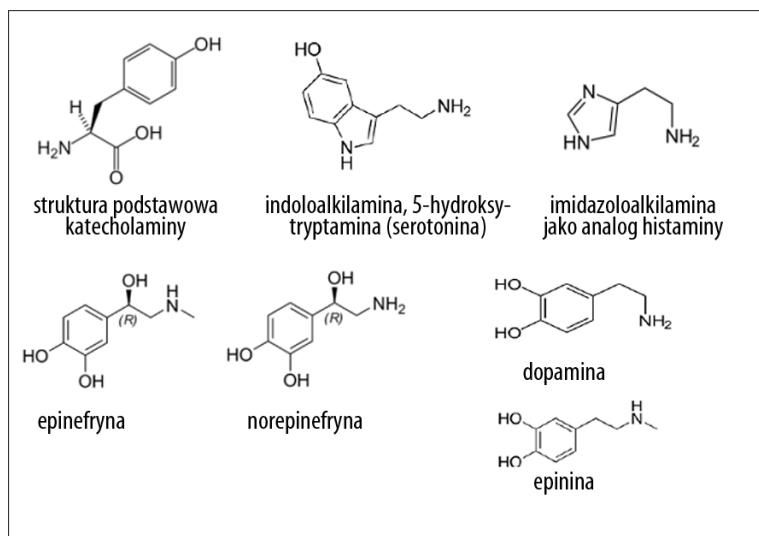
Nazwa peptydu	Masa cząsteczkowa [Da]	Liczba aminokwasów	Ładunek netto w pH fizjologicznym	Struktura przestrzenna
Aureina 1.2	1478	13	+1	
Cytropina 1.1	1613	16	+2	
Makulatyna 1.1	2145	21	+3	
Caeryna 1.1	2582	25	+4	

w błonie przyjmują one kształt helisy [3,58]. Mechanizm oddziaływania tych peptydów z dwuwarstwą lipidową badano techniką NMR w fazie stałej z użyciem izotopów ^2H i ^{31}P [8]. Te trzy peptydy mogą zakotwiczać się w rozpuszczalnych częściach błony i oddziaływać z fosfatydylocholiną. Po związaniu się do błony komórkowej aureina 1.2 i cytropina 1.1 fałdują się w pojedynczą helisę o ciągłej strukturze, a makulatyna 1.1 tworzy dwa odrębne segmenty α -helikalne rozdzielone proliną w pozycji 15, która jest niezbędna do osiągnięcia maksimum aktywności antybiotycznej [58].

Peptydy antymikrobiologiczne na skalę laboratoryjną pozyskuje się ze skóry płaza za pomocą elektrycznej stymulacji gruczołów grzbietowych. Proces ten może być powtarzany w miesięcznych odstępach [63]. Gruczoły grzbietowe płazów wydzielają 17 rodzajów aurein [35]. Aureina 1.2 ($\text{GLFDIHKKIAESF-NH}_2$) jest peptydem antymikrobiologicznym składającym się z 13 reszt aminokwasowych, wykazującym właściwości zarówno antybiotyczne jak i przeciwnowotworowe [46]. W swojej sekwencji zawiera ona na końcu N i C dwie ujemnie naładowane reszty: asparaginylową i glutaminianylową [8]. W pH fizjologicznym wartość jej ładunku wynosi +1 [58]. Jest ona wydzielana przez skórę żab: *Litoria aureus* i *Litoria raniformis* [53]. Właściwości przeciwnowotworowe aureiny 1.2 wykazano wobec nowotworu nerki, jajnika, prostaty, okrężnicy, sutka, płuc, krwi, a także przeciwko czerniakom, białaczkom i nowotworom ośrodkowego układu nerwowego [46]. Aureina 1.2 wykazuje dużą aktywność powierzchniową, wartość jej powierzchniowego ciśnienia wynosi $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i jest znacznie wyższa od innych α -helikalnych peptydów

pochodzących z płazów [28]. Badania dotyczące oddziaływania aureiny 1.2 z monowarstwą lipidową pochodzącą z komórek glejaka (T98G glioblastoma) wykazały, że peptyd gwałtownie przekracza błonę, w ciągu około 10 s [26]. Indukując przy tym duże zmiany w ciśnieniu powierzchniowym błony, powoduje zaburzenia w strukturze monowarstwy. Badania te są dowodem na to, że aureina 1.2 jest zdolna do szybkiego wnikania do komórek nowotworowych. Aureina 1.2 syntetyzowana *in vitro* wykazała całkowitą toksyczność wobec bakterii gatunku *Staphylococci*, *Enterococci*, *Streptococci* po odpowiednio 30, 40 i 20 min (przy 2-krotnej wartości MIC-minimalnego stężenia inhibitora) i po 20, 30 i 15 min (przy 4-krotnej wartości MIC) [35]. Aureina ta wykazuje również współdziałanie z antybiotykami, minocykliną i klarytromycyną. Największą aktywność antymikrobiologiczną ma w synergii z hydrofobowymi antybiotykami [35].

Aureina 2.5 ($\text{GLFDIVKKVVGAFGSL-NH}_2$) jest mało poznanym peptydem antymikrobiologicznym o budowie α -helikalnej. Jest ona peptydem silnie antybiotycznym o wartości MIC równej $30 \mu\text{M}$ w stosunku do *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*. Analiza izotermi ekstraktu błony lipidowej *B. subtilis* wykazała, że w nieobecności aureiny 2.5, ΔG_{MIX} ma wartość dodatnią, natomiast po dodaniu tego peptydu wartość ta maleje. Aureina 2.5 wykazuje więc termodynamiczną destabilizację błony komórkowej [27]. Silna toksyczność tego peptydu wynika najprawdopodobniej zarówno z jego amfifilowego charakteru jak i z jego struktury. Helisa aureiny 2.5 ma skośną orientację i może przekraczać błonę komórkową pod kątem 30° lub 60° . Peptyd ten wykazuje działanie antybiotyczne także



Ryc. 4. Typy i rodzaje podstawowych amin biogennych występujących u płazów [15]

w stosunku do drobnoustrojów, które kolonizują sztuczne serce oraz uczestniczą w zakażeniach związanych ze stosowaniem cewników [27].

Cytropina 1.1 (**GLFDVIKKVASVIGGL-NH₂**) jest szesnastaminokwasowym peptydem, wykazującym właściwości antibakteryjne, wyizolowanym z gruczołów grzbietowych *Litoria citropa* [69]. Jest ona wydzielana również przez gruczoły podbródkowe żaby [17]. W sekwencji aminokwasowej cytropiny 1.1 występują tylko jedna reszta asparaginylowa i dwie reszty lizynylowe, które wpływają na jej aktywność antybiotyczną [8,17]. W pH fizjologicznym peptyd ten ma ładunek o wartości +2 [58]. Gdy wartość ładunku jest większa niż 3, cytropina 1.1 powoduje inhibicję neuronalnej syntazy tlenu [17]. W trifluoroetanolu cytropina 1.1 przyjmuje konformację amfipatycznej α -helisy. Cytropina 1.1 nie wykazuje podobieństwa strukturalnego do innych peptydów antymikrobiologicznych wydzielanych przez skórę płazów [17].

Cytropina 1.1 syntetyzowana *in vitro* wykazała wartość MIC równą 4 $\mu\text{g/ml}$ w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus* i 2 $\mu\text{g/ml}$ w stosunku do komórek planktonu [27]. W synergii z hydrofobowymi antybiotykami minocykliną i rifampiną, aktywność cytropiny 1.1 wzrosła. Dla układu: cytropina 1.1-minocyklina wartości MIC wynosiły odpowiednio 1 $\mu\text{g/ml}$ i 2 $\mu\text{g/ml}$, a dla układu cytropina 1.1-rifampina, odpowiednio 0,5 $\mu\text{g/ml}$ i 1 $\mu\text{g/ml}$. Oznacza to, że takie układy powodują znaczną redukcję materiału bakteryjnego (z 6 $\log_{10}$ spadku liczebności bakterii na cewnikowo-żylnych tkankach w porównaniu do próby kontrolnej), jak i całkowity zanik patogenu we krwi [17]. Dzięki takim właściwościom, jak wysoka aktywność antybiotyczna zdolność do tworzenia wiązań kowalencyjnych na powierzchni błony komórkowej bakterii i współdziałanie z hydrofobowymi antybiotykami cytropina 1.1 może posłużyć do zaprojektowania nowej linii antybiotyków i leków wspomagających ochronę sztucznych implantów.

Caeryna 1.1 jest antybiotycznym peptydem należącym do grupy caeryn, wyizolowanym z *Litoria caerulea*, *Litoria chloris*, *Litoria gilleni*, *Litoria splendida* i *Litoria xanthomera* [45,59,65,72]. Jej sekwencja składa się z 25 reszt

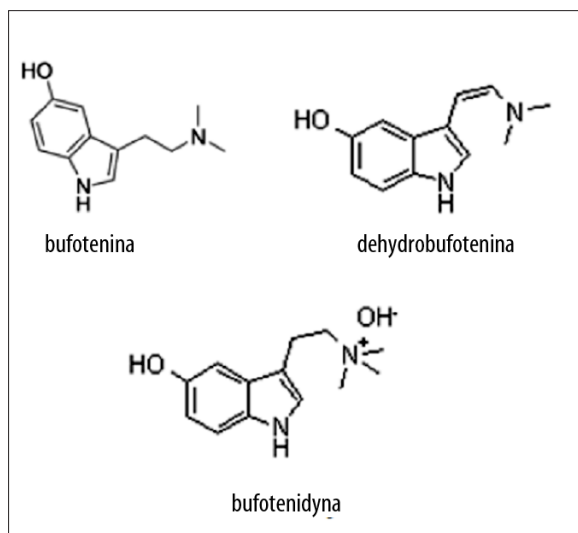
aminokwasowych [46]. Ze wszystkich caeryn tylko caeryna 1.1 charakteryzuje się złożoną aktywnością. Oprócz właściwości antymikrobiologicznych, przeciwrzybiczych i przeciwnowotworowych jest ona zdolna do przyłączania się do kalmuliny, powodując zmianę jej konformacji. Utrudnia to przyłączenie się neuronalnej syntazy tlenu azotu do kalmuliny i wpływa na zahamowanie syntazy tlenu azotu [4,29]. Caeryna 1.1 i caeryna 1.9, a także makulatyna 1.1 gwałtownie i całkowicie doprowadzają także do inhibicji zainfekowanych limfocytów T [65]. Wykazano również, że peptydy te uniemożliwiają wirusowi HIV przedostawanie się z dendrytów do ciała neuronu, a także niszczą błonę wirusa [65]. Makulatyna 1.1 (**GLFGVALKVAAHVVPAAIEHF-NH₂**) zawiera 21 reszt aminokwasowych. Jest peptydem wykazującym właściwości antybiotyczne [16,46]. W pH fizjologicznym ma ładunek +3 [58]. Wyizolowano ją ze skóry żaby *Litoria genimaculata* [54].

Bombinina zaś była pierwszym peptydem wyizolowanym ze skóry płaza *Bombina bombina*, wykazującym właściwości antymikrobiologiczne i hemolityczne [20].

Magainina 2 jest antymikrobiologicznym peptydem wyizolowanym ze skóry *Xenopus laevis* [51, 52]. Analog tego peptydu (MSI-78A), charakteryzuje się aktywnością wobec błony komórkowej dwóch linii bakterii *Helicobacter pylori*: ATCC 43526 i ATCC 43579 [37].

AMINY BIOGENNE

Aminy biogenne wydzielane przez gruczoły skórne u płazów są pochodnymi katecholamin i indoloalkilamin (ryc.4) [15,43,57]. Wyróżniono trzy podstawowe grupy amin [15]. Do pierwszej należą indoloalkilaminy zawierające 5-hydroksytryptaminę (serotoninę) charakterystyczną dla większości płazów oraz pochodne N-metylowane, takie jak bufotenina i bufotenidyna, które są właściwe dla wydzielin salamander, żab i ropuch. Drugą grupę stanowią imidazoloalkilaminy i związki podobne do histaminy, obecnie otrzymywane z wydzielin żab świstkowatych (*Leptodactylidae*) i rzekotkowatych (*Hylidae*) oraz hydroksylofenyloalkilaminy, do których można zaliczyć leptodaktylinę z wydzielin żab z rodzaju świstkowatych. Trzecią



Ryc. 5. Wzory strukturalne wybranych prostych bufotoksyn i bufogenin [15,19]

grupę amin biogennych stanowią epinefryna i pochodne norepinefryny zidentyfikowane u gatunku żab *Bufo bufo*. Ponadto wydzieliny gruczołów skórnych u niektórych ropuch zawierają także dopaminę i epininę (ryc. 4) [15,57].

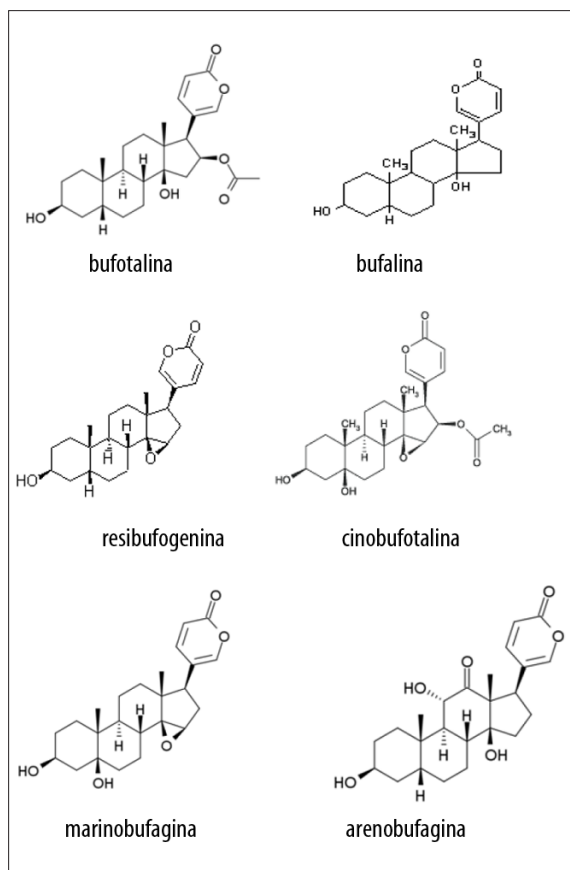
BUFOGENINY I BUFOTOKSYNY

Bufogeniny i bufotoksyny należą do grupy związków steroidowych zawierających układ cyklopentanoperhydrofenantrenu, zwanego steranem. Bufogeniny i bufotoksyny przyspieszają pracę układu naczyniowo-krwionośnego, powodując zwiększenie siły uderzeń serca i zmniejszenie jednocześnie częstotliwości akcji serca. Wiele z tych związków wykazuje miejscowe działanie znieczulające [43, 57]. Związki te są gromadzone zwłaszcza w parotydach, u przedstawicieli rodziny ropuchowatych (*Atelopus*, *Bufo*, *Ansonia*, *Dendrophryniscus*, *Melonophryniscus*) i w znacznie mniejszej ilości u niektórych innych płazów. Do tej grupy związków zaliczyć można: bufotalinę, bufaginę, bufateninę, resibufogeninę, bufalinę, bufatenidynę, dehydrobufateninę, cinobufotalinę, marinobufotoksynę, marinobufaginę, telocynobufaginę i arenobufaginę (ryc. 6). Wykazują one działanie silnie kardiotoksyczne [57]. Marinobufagina i telocynobufagina mają też właściwości antybakteryjne, zaś bufalina i bufotalina przeciwnowotworowe [17,43,57].

Pochodne indoloalkiloamin zawierają oprócz bufoteniny także inne związki, takie jak: o-metylowana bufotenina, bufotionina i dehydrobufotenina. Te substancje chemiczne wykazują działanie halucynogenne, zwężają naczynia krwionośne oraz mogą wywoływać nawet konwulsje. Wykazano, że w obrębie gatunku i podgatunku *Bufo bufo* aminy biogenne różnią się między sobą. Mogą być pomocne także w charakterystyce ewolucyjnego pochodzenia organizmów oraz jako czynniki taksonomiczne w celu określania przynależności gatunkowej poszczególnych organizmów (ryc. 5) [15].

ALKALOIDY EGZOGENNE I ENDOGENNE

Alkaloidy są to związki organiczne o zasadowym charakterze, które z definicji są układami cyklicznymi



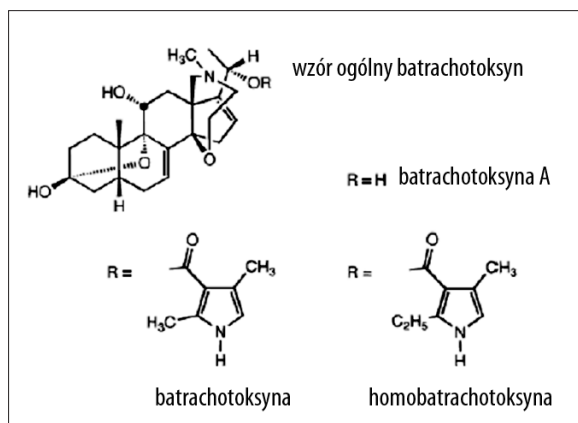
Ryc. 6. Wzory strukturalne wybranych bufotoksyn i bufogenin o charakterze steroidowym [15,19]

i charakteryzują się obecnością przynajmniej jednego atomu azotu w pierścieniu lub poza nim. W obrębie omawianej gromady, alkaloidy zidentyfikowano jak dotąd w rodzinie drzewołazowatych (*Dendrobatidae*), chociaż spotkać je można także u niektórych salamander (*S. salamandra*), traszek (*Triturus spp.*, *Taricha spp.*) oraz w wydzielinach żab i ropuch (*Mantella spp.*, *Pseudophryne corroboree*, *Atelopus spp.*, *Brachycephalus ephippium* i *Bufo marinus*) [25,40].

Dotychczasowe badania wskazują, że większość tych związków pochodzi ze źródeł egzogennych, głównie od owadów i stonóg, które są składnikiem diety osobników z rodziny *Dendrobatidae*. Jest to pośredni dowód na to, że niektóre substancje mogą być wytwarzane *de novo* lub też mogą być pozyskiwane z pożywienia lub z organizmów symbiotycznych. Ponadto zmienność składowa alkaloidów u poszczególnych gatunków płazów wynikać może ze sposobu ich odżywiania i statusu w łańcuchu pokarmowym [15,21,24,43]. Alkaloidy pirolizydynowe i indolizydynowe pochodzą z pożywienia płazów. Pierwotnym ich źródłem są mrówki lub stonogi wytwarzające oksymy pirolizydynowe [25].

BATRACHOTOKSYNY

Pierwsze batrachotoksyny wyizolowano z ekstraktów wydzielin gruczołów skórnych pięciu gatunków żab neotropikalnych z rodziny *Dendrobatidae* (rodzaj *Phylllobates*).



Ryc. 7. Wzory strukturalne batrachotoksyn [25]

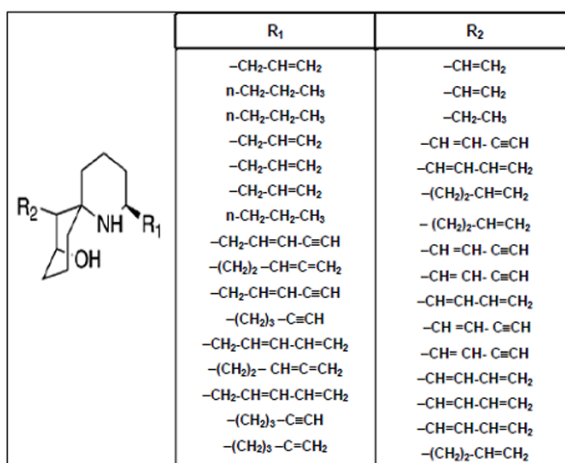
Oprócz samej batrachotoksyny, zwierzęta te wydzielają jeszcze homobatrachotoksynę oraz o wiele mniej toksyczny prekursor – batrachotoksynę A (ryc. 7). Wymienione związki powodują depolaryzację komórek nerwowych i komórek mięśniowych w wyniku swoistego otwierania i zamykania kanałów sodowych w błonach komórkowych [48]. Interesujące jest to, że kanały sodowe żab *Phyllobates* są niewrażliwe na działanie samych batrachotoksyn. Substancje te u innych gatunków uniemożliwiają komórkom nerwowym przewodzenie impulsów, blokując rozkurcz mięśni. Skutkiem takiego działania może być arytmia, migotanie komór serca oraz zatrzymanie pracy serca.

Najwyższy poziom batrachotoksyn zanotowano u *Phyllobates terribilis* (1 mg/żaba) oraz u *Phyllobates bicolor* i *Phyllobates aurotaenia* [22]. Niektóre jednak populacje, takie jak *Phyllobates lugubris* w ogóle nie mają tych związków w skórze. Dawka letalna tego typu alkaloidów podanych podskórnie myszom wynosi 1 µg/kg m.c. (dla batrachotoksyny), 3 µg/kg m.c. (dla homobatrachotoksyny), 250 µg/kg m.c. (dla dihydrobatrachotoksyny). W przypadku człowieka dawka letalna szacowana jest poniżej 300 µg, czyli na 1/3 zawartości batrachotoksyn w skórze jednego osobnika *Phyllobates terribilis* [61]. Dużą zawartość batrachotoksyn wykazano w ciele nowogwinejskich chrząszczach z rodzaju *Choresine* (rodzina *Melyridae*) [32]. Chrząszcze te znaleziono również w żołądkach ptaków *Pitohui*, a ponieważ ta rodzina owadów jest kosmopolityczna, niewykluczone, że pokrewne chrząszcze występują w Kolumbii, gdzie są głównym źródłem batrachotoksyn dla płazów [31,32].

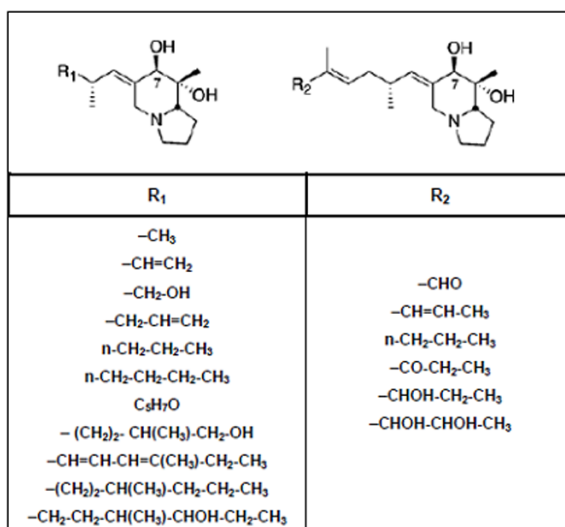
HISTRIONIKOTOKSYNY

Histrionikotoksyny to substancje chemiczne reprezentujące drugą klasę alkaloidów charakterystycznych dla płazów. Zawierają one piperydynowy pierścień oraz boczne łańcuchy acetylenowe, olefinowe (ryc. 8). Związki te występują przede wszystkim u rodziny płazów drzewołazowatych (*Dendrobatidae*), z rodzaju *Phyllobates*, *Dendrobates* i *Epipedobates* [21,25].

Histrionikotoksyna jest silnym niekompetycyjnym antagonistą wobec acetylocholinergicznym receptorów nikotynowych [6]. Trucizna ta ma zdolność wiązania się z miejscem regulatorowym w obrębie podjednostki δ kompleksu



Ryc. 8. Różnorodność podstawników w obrębie histrionikotoksyn (HTX) [25]



Ryc. 9. Różnorodność podstawników w obrębie dwóch rodzajów pumiliotoksyn (PTX) [25]

tworzącego kanały jonowe i ma powinowactwo z kanałami sodowymi i potasowymi, powodując zaburzenia w ich funkcjonowaniu.

PUMILIOTOKSYNY

Pumiliotoksyny są związkami chemicznymi charakterystycznymi tylko dla rodziny płazów *Dendrobatidae*. Do tej grupy związków zaliczyć można przede wszystkim struktury indolizydynowe (pumiliotoksyny i allopumiliotoksyny) oraz chinolizydynowe (homopumiliotoksyny) (ryc. 9). W każdym przypadku związki te charakteryzuje obecność zmiennych alkildienowych łańcuchów bocznych. Grupa tych alkaloidów występuje w skórze tych tylko płazów, które mają dodatkowo lipofilowe alkaloidy [25]. Wyjątkiem są tutaj salamandry, które do swoich wydzielin skórnych wytwarzają własne salamandryny. Mimo szerokiej dystrybucji alkaloidów u żab, istnieją takie populacje żab, które nie mają alkaloidów będących pumiliotoksynami lub

ich śladowe ilości [21,25]. Związki te są aktywnymi truciźnikami, które działają głównie na kanały sodowe, a także na wapniowe i służą jako substancje obronne stosowane przez płazy wobec atakujących je drapieżników [21,23].

EPIBATYDYNA A TERAPIA PRZECIWBÓLOWA

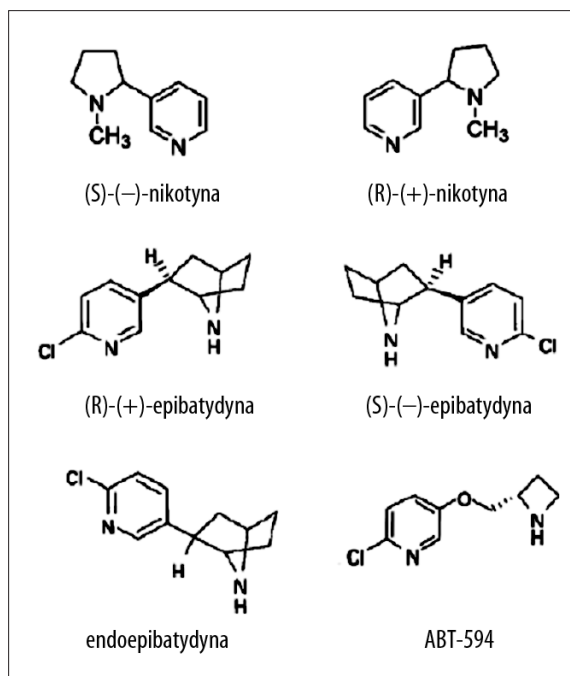
Epibatydynę po raz pierwszy wyizolowano z ekstraktów skórnych *Epipedobates tricolor*, żab zamieszkujących Ekwador. Badania przeprowadzone na myszach dowiodły, że neurotoksyna ta charakteryzuje się 200-krotnie większym działaniem przeciwbólowym niż morfina w przypadku tkanek uszkodzonych bodźcem termicznym [62]. Dodatkowo stwierdzono, że takie działanie epibatydyny nie jest w żaden sposób hamowane przez nalokson (opioიდowy antagonist), co zasugerowało, że sposób oddziaływania epibatydyny jest inny niż morfiny [14,30]. Ze względu na inny mechanizm działania, związek ten stał się szeroko badanym potencjalnym czynnikiem terapeutycznym.

Epibatydyna jest substancją silnie toksyczną, mogącą wywołać hipertensję, a także paraliż oddechowy. Dodatkowe modyfikacje chemiczne mogą sprawić jednak, że może się stać użytecznym związkiem terapeutycznym. Na podstawie syntetycznych izomerów optycznych epibatydyny zbadano jej właściwości farmakologiczne [52,70]. Epibatydyna może tworzyć dwa enancjomery (+) i (–), inaczej oznaczane jako R-epibatydyna i S-epibatydyna (ryc. 10). Naturalnie występującą postacią epibatydyny jest enancjomer R (+). Ponadto wykazano, że między enancjomerami R i S występują małe różnice w aktywności farmakologicznej (ryc. 10) [52,62]. Badania epibatydyny dotyczące jej działania znieczulającego przeprowadzono na gryzoniach [62]. Wykazały one, że dawka 2,5 µg epibatydyny na kilogram masy ciała wywołuje u tych zwierząt laboratoryjnych stan niewrażliwości na ból [44]. W tych badaniach stosowano także morfinę w celu porównania efektu terapeutycznego i okazało się, że w celu wywołania podobnej niewrażliwości na ból potrzebna jest dawka 10 mg morfiny na kilogram masy ciała. Eksperymenty te wykazały, że epibatydyna jest niemal tak samo aktywna, jak i skuteczna, co morfina. Nie pojawiły się doniesienia naukowe o zastosowaniu samej epibatydyny u ludzi jako środka znieczulającego, chociaż pochodna tego związku o nazwie ABT-594 (Tebanicline) jest w drugiej fazie badań klinicznych [39,73]. Jednak już wiadomo, że ma ona pewne niepożądane działania, takie jak: zaburzenia układu pokarmowego u człowieka (ryc. 10) [7].

Epibatydyna wykazuje brak powinowactwa do różnorodnych receptorów neuronalnych, takich jak: receptor benzodiazepinowy, receptor serotonergiczny, receptor dopaminergiczny, receptor adrenergiczny, receptor GABA, a także wobec receptorów bradykininy, cholecystokininy [66]. Ponadto epibatydyna charakteryzuje się niskim stopniem powinowactwa wobec receptora muskarynowego, pobudzanego przez acetylocholinę [44].

PEPTYDY OPIOIDOWE

Peptydy opioidowe, stanowią grupę substancji aktywnych biologicznie, które w znaczących ilościach znajdują się w wydzielinach gruczołów skórnych niektórych płazów. Dwie główne grupy peptydów opioidowych,

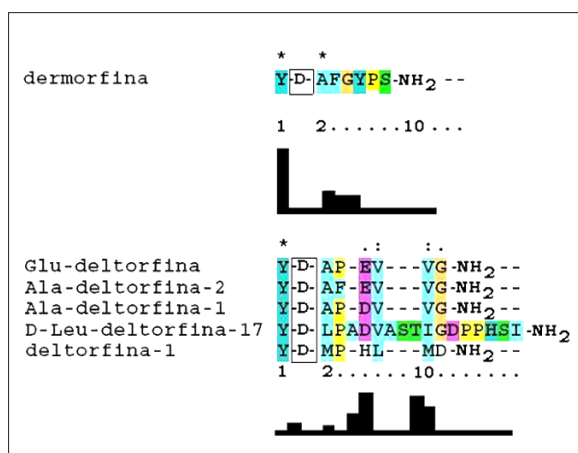


Ryc. 10. Wzory strukturalne analogów nikotyn i epibatydyny [52]

to dermorfiny (substancje agonistyczne receptora μ -opioიდowego) i deltorfiny (substancje agonistyczne receptora δ -opioიდowego). Związki te wyizolowano z żab zamieszkujących Amerykę Południową, podrodziny *Phyllomedusinae* (gatunki *Phyllomedusa*, *Agalychnis*, *Pachymedusa*) [43]. Charakterystyczną cechą peptydów opioიდowych jest obecność D-enancjomerycznego aminokwasu w drugiej pozycji od N końca [64]. Peptydy opioიდowe powstają w wyniku zmian potranslacyjnych z prohormonów (proopiomelanokortyna, proenkefalina, prodynorfina) [5,42]. Prohormony i peptydy opioიდowe są głównie wytwarzane przez komórki nerwowe ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego oraz komórki układu hormonalnego, pokarmowego i odpornościowego [38].

U brazylijskich żab z gatunku *Phyllomedusa burmeisteri* zidentyfikowano peptyd podobny do dermorfina o sekwencji aminokwasowej **YLFADVSTIGDFFHSINH₂**, zwany D-Leu deltorfiną 17. Peptyd ten składa się z 17 aminokwasów, w pozycji drugiej łańcucha peptydowego występuje reszta D-leucylowa [43,49]. W wyniku przeprowadzonego skryningu biblioteki cDNA pochodzącego z dwóch kolejnych gatunków żab *Phyllomedusinae*, czyli *Pachymedusa dactylos* i *Agalychnis annae* oraz po porównaniu sekwencji aminokwasowej dermorfina i deltorfina (ryc. 11) pochodzących od *Phyllomedusa sauvagei* i *Phyllomedusa bicolor*, zidentyfikowano dodatkowe cztery kopie DNA kodujące deltorfinę o następującej sekwencji aminokwasowej **YIFHLMD-NH₂** [41]. Ten peptyd zawiera resztę D-izoleucylową na drugiej pozycji i mimo że sekwencja ta przypomina nieco deltorfinę, wykazuje mniejsze powinowactwo wobec receptorów δ -opioიდowych niż pozostałe deltorfiny [49,60].

Na podstawie badań fizyko-chemicznych stwierdzono, że dermorfina i deltorfina zawierają charakterystyczną sekwencję aminokwasową na N końcu peptydu, Tyr-D-Xaa-Phe,



Ryc. 11. Porównanie sekwencji aminokwasowych dermorfina i deltorfin izolowanych z wydzieliny skórnych płazów z zaznaczeniem konfiguracji D aminokwasu w obrębie drugiej pozycji, charakteru peptydów oraz wraz z określeniem podobieństwa tych sekwencji [wg 43, 49; aplikacja komputerowa Clustal X]

gdzie reszty, tyrozyny i fenyloalaniny wykazują konfigurację L, natomiast reszta aminokwasowa oznaczona jako Xaa znajdująca się na drugiej pozycji, jest D-aminokwasem (alanina lub metionina lub leucyna) (ryc. 11) [49]. Badania dotyczące wiązania się tych peptydów do receptora wykazały, że N-końcowa sekwencja aminokwasowa Tyr-D-Xaa-Phe jest istotna w wiązaniu się tego peptydu z receptorem [41,49].

Chociaż wszystkie peptydy podobne do dermorfin czy deltorfin izolowane ze skóry płazów mają w swojej strukturze D-aminokwas na drugiej pozycji, to kodon charakterystyczny dla genu dermorfina i deltorfiny koduje oczywiście L-aminokwas [49]. Dlatego też reszta ta musi być przekształcona do enancjomerycznej postaci D. Jest to rezultat modyfikacji na poziomie potranslacyjnym, charakterystycznej dla białka prekursorowego i potwierdzone dotychczas jedynie dla płazów [49].

Receptory opioidowe oddziałujące z peptydami opioidowymi należą do siedmiohelisowych receptorów błonowych. Charakteryzują się dużym zróżnicowaniem, zarówno pod względem farmakologicznym, jak i biochemicznym. Obecnie wyróżniamy trzy typy klasycznych receptorów opioidowych: MOR (mu, μ), DOR (delta, δ), KOR (kappa, κ) oraz jeden receptor nieklasyczny-ORL (opioid receptor like) [18]. Dodatkowo w obrębie każdego typu receptorów opioidowych wyróżniamy izoformy: μ 1 i μ 2, δ 1 i δ 2 oraz κ 1, κ 2 i κ 3 właściwe dla receptora typu κ . Podział ten wynika z obecności wielu miejsc wiązania określonego liganda przez receptory.

Badania prowadzone zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* dowiodły, że dermorfina z dużą siłą i w sposób selektywny wiąże się z receptorami opioidowymi typu μ [49]. Deltorfina wiąże się do receptorów opioidowych typu δ . Negatywny ładunek tetrapeptydu na N-końcu deltorfiny jest podstawowy dla selektywności wobec receptora δ [49].

Natomiast Ala-deltorfina wykazuje większy stopień selektywności wobec receptorów opioidowych typu δ [49]. Wynika to przede wszystkim ze składu aminokwasowego

tetrapeptydu C końca i z obecności anionowej reszty aminokwasowej, która odgrywa tutaj główną rolę. Dodatkowo, wysoki stopień selektywności wobec receptora δ przypisywany jest głównie zwartej strukturze przestrzennej peptydu opioidowego, która jest preferowana przez receptor δ -opiatowy. Receptory typu μ , preferują bardziej peptydy przyjmujące wydłużoną konformację w obrębie dermorfin [49].

Przeprowadzone dotąd badania sugerują, że komórkowy system opioidowy, receptory opioidowe i peptydy opioidowe są odpowiedzialne za procesy supresji nowotworów. Są one natomiast nieaktywne w komórkach zdrowej tkanki. Przypuszczalny mechanizm tej inaktywacji może polegać np.: na niewytwarzaniu biologicznie aktywnych peptydów opioidowych i ich receptorów lub na obecności pewnych czynników hamujących ich prawidłowe funkcjonowanie, takich jak nikotyna, znana bardzo dobrze jako antagonist opioidowy w komórkach nowotworowych płuc [33,49]. Potwierdzono również, że peptyd opioidowy dynorfina A jest zdolny do stymulacji proliferacji komórek w linii komórkowej DU 145 wyprowadzonej z komórek nowotworowych prostaty [33]. Zidentyfikowano także peptydy opioidowe i ich receptory w początkowym stadium nowotworów sutka, podczas gdy w komórkach bez nowotworu nie zauważono ekspresji elementów systemu opioidowego [33].

WNIOSKI I PODSUMOWANIE

Wydzielina gruczołów jadowych znajdujących się w skórze płazów jest bogata w różnorodne związki o znaczeniu farmakologicznym. Są nimi peptydy antymikrobiologiczne: aureiny, cytropiny, makulatyny i caeryny, peptydy opioidowe, a także pochodne indoloalkilamin: bufoteniiny, czy pochodne cholesterolu: bufogeniny i bufotoksyny. Wydzielina gruczołów jadowych może również zawierać alkaloidy np.: batrachotosyny, histronikotoksyny, epibatydynę, czy peptydy opioidowe: dermorfina i deltorfiny.

Peptydy antymikrobiologiczne wykazują silne działanie przeciw takim bakteriom jak: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*. Aureina 1.2 syntetyzowana *in vitro* może również zwiększać skuteczność działania dotychczas stosowanych antybiotyków hydrofobowych, takich jak minocyclina i klarytromycyna [28]. Dzięki swoim toksycznym właściwościom aureina 1.2 jest również zdolna do szybkiego wnikania do komórek nowotworowych, prowadząc do ich lizy [26].

Inny peptyd antymikrobiologiczny cytropina 1.1 charakteryzuje się silnym działaniem antybiotycznym i współdziałaniem z hydrofobowymi antybiotykami, takimi jak minocyclina czy rifampina [17]. Dzięki tym właściwościom cytropina 1.1 może posłużyć do zaprojektowania nowej linii antybiotyków, leków wspomagających ochronę mikrobiologiczną implantów, czy też leków zwiększających skuteczność zwalczania infekcji bakteryjnych i grzybiczych. Peptyd ten powoduje także inhibicję neuronalnej syntazy tlenu azotu, która odgrywa znaczącą rolę w sygnalizacji międzykomórkowej [29].

Caeryna 1.1. jest peptydem antymikrobiologicznym o różnorodnej aktywności. Oprócz właściwości antymikrobiologicznych, przeciwgrzybiczych i antynowotworowych jest ona zdolna do przyłączania się do kalmoduliny [4]. Caeryna

1.1 i caeryna 1.9, a także makulatyna 1.1 gwałtownie i całkowicie hamują zakażone limfocyty T [65].

Bufoteniny, pochodne indoloalkilamin, mają nie tylko właściwości halucynogenne, ale także są zdolne do podnoszenia ciśnienia krwi przez zwężanie naczyń krwionośnych. Bufogeniny i bufotoksyny powodują przyspieszenie pracy układu naczyniowo-krwionośnego, przez zwiększenie siły uderzeń serca i jednocześnie zmniejszenie częstotliwości jego akcji. Ponadto wiele z bufogenin i bufotoksyn wykazuje działanie miejscowego środka znieczulającego [57].

Batrachotoksyny mają nietypową strukturę chemiczną, dzięki której mogą służyć do badań receptorów komórkowych i do analizy transbłonowego transportu jonów. Substancje te powodują depolaryzację błony komórek nerwowych i mięśniowych. Uniemożliwiają komórkom nerwowym przewodzenie impulsów. Skutkiem tego może być arytmia, migotanie komór serca, czy nawet zatrzymanie pracy serca [68].

Epibatydyna jest alkaloidem o właściwościach silnie przeciwbólowych, skuteczniejszym od morfiny. Substancja ta charakteryzuje się jednak silną toksycznością, mogącą wywołać nadciśnienie i paraliż oddechowy [12,62].

Gruczoły jadowe płazów mogą wydelać związki o właściwościach bioadhezyjnych, nadające skórze wytrzymałość na rozciąganie. Substancje te mogą znaleźć zastosowanie w chirurgii plastycznej do produkcji biokompatybilnych klejów, czy też posłużyć do pozyskiwania farmaceutyków przyspieszających procesy gojenia się ran. Wydzielina gruczołów jadowych żab jest więc bogatym źródłem substancji leczniczych, które mogłyby się stać alternatywą dla dotychczas stosowanych farmaceutyków. Wiele opisanych w tej pracy peptydów charakteryzuje się nietypową strukturą i właściwościami, dzięki którym mogłyby one służyć do projektowania nowej linii leków przeciwko infekcjom bakteryjnym, grzybiczym, wirusowym [71] czy w terapiach antynowotworowych [33].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Agerberth B., Gudmundsson G.H.: Host antimicrobial defence peptides in human disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006; 306: 67–90
- [2] Ambroggio E.E., Separovic F., Bowie J., Fidelio G.D.: Surface behaviour and peptide-lipid interactions of the antibiotic peptides, maculatin and citropin. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1664: 31–37
- [3] Ambroggio E.E., Separovic F., Bowie J.H., Fidelio G.D., Bagatolli L.A.: Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. *Biophys. J.*, 2005; 89: 1874–1881
- [4] Appelt C., Wessolowski A., Dathe M., Schmieder P.: Structures of cyclic, antimicrobial peptides in a membrane-mimicking environment define requirements for activity. *J. Pept. Sci.*, 2008; 14: 524–527
- [5] Apponyi M.A., Pukala T.L., Brinkworth C.S., Maselli V.M., Bowie J.H., Tyler M.J., Booker G.W., Wallace J.C., Carver J.A., Separovic F., Doyle J., Llewellyn L.E.: Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides*, 2004; 25: 1035–1054
- [6] Arias H.R.: Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1376: 173–220
- [7] Arneric S.P., Holladay M., Williams M.: Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem. Pharmacol.*, 2007; 74: 1092–1101
- [8] Balla M.S., Bowie J.H., Separovic F.: Solid-state NMR study of antimicrobial peptides from Australian frogs in phospholipid membranes. *Eur. Biophys. J.*, 2004; 33: 109–116
- [9] Boland M.P., Separovic F.: Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian tree frogs. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1758: 1178–1183
- [10] Boman H.G.: Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.*, 2003; 254: 197–215
- [11] Boman H.G.: Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 1991; 65: 205–207
- [12] Bonhaus D.W., Bley K.R., Broka C.A., Fontana D.J., Leung E., Lewis R., Shieh A., Wong E.H.: Characterization of the electrophysiological, biochemical and behavioral actions of epibatidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995; 272: 1199–1203
- [13] Brogren K.A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005; 3: 238–250
- [14] Bunnelle W.H., Daanen J.F., Ryther K.B., Schrimpf M.R., Dart M.J., Gelain A., Meyer M.D., Frost J.M., Anderson D.J., Buckley M., Curzon P., Cao Y.J., Puttfarcken P., Searle X., Ji J., Putman C.B., Surowy C., Toma L., Barlocco D.: Structure-activity studies and analgesic efficacy of N-(3-pyridinyl)-bridged bicyclic diamines, exceptionally potent agonists at nicotinic acetylcholine receptors. *J. Med. Chem.*, 2007; 50: 3627–3644
- [15] Clarke B.T.: The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 1997; 72: 365–379
- [16] Chia C.S., Torres J., Cooper M.A., Arkin I.T., Bowie J.H.: The orientation of the antibiotic peptide maculatin 1.1 in DMPG and DMPC lipid bilayers. Support for a pore-forming mechanism. *FEBS Lett.*, 2002; 512: 47–51
- [17] Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Kamysz W., Orlando F., Mocchegiani F., Silvestri C., Licci A., Chiodi L., Lukasiak J., Saba V., Scalise G.: Citropin 1.1-treated central venous catheters improve the efficacy of hydrophobic antibiotics in the treatment of experimental staphylococcal catheter-related infection. *Peptides*, 2006; 27: 1210–1216
- [18] Corbett A.D., Henderson G., Mcknight A.T., Paterson S.J.: 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br. J. Pharmacol.*, 2006; 147(Suppl.1): S153–S162
- [19] Cruz J.S., Matsuda H.: Arenobufagin, a compound in toad venom, blocks Na⁺-K⁺ pump current in cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 1993; 239: 223–226
- [20] Csordás A., Michl H.: Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. *Toxicon*, 1969; 7: 103–108
- [21] Daly J.W.: Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. *J. Nat. Prod.*, 1998; 61: 162–172
- [22] Daly J.W.: The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 9–13
- [23] Daly J.W., Kaneko T., Wilham J., Garraffo H.M., Spande T.F., Espinosa A., Donnelly M.A.: Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 13996–14001
- [24] Daly J.W., Noimai N., Kongkathip B., Kongkathip N., Wilham J.M., Garraffo H.M., Kaneko T., Spande T.F., Nimit Y., Nabhitabhata J., Chan-Ard T.: Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. *Toxicon*, 2004; 44: 805–815
- [25] Daly J.W., Spande T.F., Garraffo H.M.: Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *J. Nat. Prod.*, 2005; 68: 1556–1575
- [26] Dennison S.R., Harris F., Phoenix D.A.: The interactions of aurein 1.2 with cancer cell membranes. *Biophys. Chem.*, 2007; 127: 78–83
- [27] Dennison S.R., Morton L.H., Shorrocks A.J., Harris F., Phoenix D.A.: A study on the interactions of Aurein 2.5 with bacterial membranes. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2009; 68: 225–230
- [28] Dennison S.R., Whittaker M., Harris F., Phoenix D.A.: Anticancer α -helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2006; 7: 487–499

- [29] Doyle J., Llewellyn L.E., Brinkworth C.S., Bowie J.H., Wegener K.L., Rozek T., Wabnitz P.A., Wallace J.C., Tyler M.J.: Amphibian peptides that inhibit neuronal nitric oxide synthase. Isolation of lesuerin from the skin secretion of the Australian Stony Creek frog *Litoria lesueuri*. Eur. J. Biochem., 2002; 269: 100–109
- [30] Dukat M., Glennon R.A.: Epibatidine: impact on nicotinic receptor research. Cell. Mol. Neurobiol., 2003; 23: 365–378
- [31] Dumbacher J.P., Beehler B.M., Spande T.F., Garraffo H.M., Daly J.W.: Homobatrachotoxin in the genus *Pitohui*: chemical defense in birds? Science, 1992; 258: 799–801
- [32] Dumbacher J.P., Wako A., Derrickson S.R., Samuelson A., Spande T.F., Daly J.W.: Melyrid beetles (*Choresine*): a putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and toxic passerine birds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004; 101: 15857–15860
- [33] Fichna J., Janecka A.: Opioid peptides in cancer. Cancer Metastasis Rev., 2004; 23: 351–366
- [34] Gehman J.D., Luc F., Hall K., Lee T.H., Boland M.P., Pukala T.L., Bowie J.H., Aguilar M.I., Separovic F.: Effect of antimicrobial peptides from Australian tree frogs on anionic phospholipid membranes. Biochemistry, 2008; 47: 8557–8565
- [35] Giacometti A., Cirioni O., Riva A., Kamysz W., Silvestri C., Nadolski P., Della Vittoria A., Lukasiak J., Scalise G.: *In vitro* activity of aurein 1.2 alone and in combination with antibiotics against Gram-positive nosocomial cocci. Antimicrob. Agents Chemother., 2007; 51: 1494–1496
- [36] Hwang P.M., Vogel H.J.: Structure-function relationships of antimicrobial peptides. Biochem. Cell Biol., 1998; 76: 235–246
- [37] Iwahori A., Hirota Y., Sampe R., Miyano S., Takahashi N., Sasatsu M., Kondo I., Numao N.: On the antibacterial activity of normal and reversed magainin 2 analogs against *Helicobacter pylori*. Biol. Pharm. Bull., 1997; 20: 805–808
- [38] Janson W., Stein C.: Peripheral opioid analgesia. Curr. Pharm. Biotechnol., 2003; 4: 270–274
- [39] Joshi S.K., Mikusa J.P., Weaver B., Honore P.: Morphine and ABT-594 (a nicotinic acetylcholine agonist) exert centrally mediated antinociception in the rat cyclophosphamide cystitis model of visceral pain. J. Pain, 2008; 9: 146–156
- [40] Karalliedde L.: Animal toxins. Br. J. Anaesth., 1995; 74: 319–327
- [41] Kreil G.: Peptides containing a D-amino acid from frogs and molluscs. J. Biol. Chem., 1994; 269: 10967–10970
- [42] Laurent V., Jaubert-Miazza L., Desjardins R., Day R., Lindberg I.: Biosynthesis of proopiomelanocortin-derived peptides in prohormone convertase 2 and 7B2 null mice. Endocrinology, 2004; 145: 519–528
- [43] Lazarus L.H., Bryant S.D., Attila M., Salvadori S.: Frog skin opioid peptides: a case for environmental mimicry. Environ. Health Perspect., 1994; 102: 648–654
- [44] Lloyd G.K., Williams M.: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2000; 292: 461–467
- [45] Maclean M.J., Brinkworth C.S., Bilusich D., Bowie J.H., Doyle J.R., Llewellyn L.E., Tyler M.J.: New caerin antibiotic peptides from the skin secretion of the dainty green tree frog *Litoria gracilentia*. Identification using positive and negative ion electrospray mass spectrometry. Toxicon, 2006; 47: 664–675
- [46] Marcotte I., Wegener K.L., Lam Y.H., Chia B.C., de Planque M.R., Bowie J.H., Auger M., Separovic F.: Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes. Chem. Phys. Lipids, 2003; 122: 107–120
- [47] Mookherjee N., Hancock R.E.: Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. Cell. Mol. Life Sci., 2007; 64: 922–933
- [48] Nau C., Wang G.K.: Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ channels. J. Membr. Biol., 2004; 201: 1–8
- [49] Negri L., Melchiorri P., Lattanzi R.: Pharmacology of amphibian opiate peptides. Peptides, 2000; 21: 1639–1647
- [50] Nicolas P., Vanhoye D., Amiche M.: Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. Peptides, 2003; 24: 1669–1680
- [51] Porter E.A., Wang X., Lee H.S., Weisblum B., Gellman S.H.: Non-haemolytic β -amino-acid oligomers. Nature, 2000; 404: 565
- [52] Porter E.A., Weisblum B., Gellman S.H.: Mimicry of host-defense peptides by unnatural oligomers: antimicrobial β -peptides. J. Am. Chem. Soc., 2002; 124: 7324–7330
- [53] Rozek T., Bowie J.H., Wallace J.C., Tyler M.J.: The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian bell frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. Part 2. Sequence determination using electrospray mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2000; 14: 2002–2011
- [54] Rozek T., Waugh R.J., Steinborner S.T., Bowie J.H., Tyler M.J., Wallace J.C.: The maculatin peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria genimaculata*: a comparison of the structures and antibacterial activities of maculatin 1.1 and caerin 1.1. J. Pept. Sci., 1998; 4: 111–115
- [55] Schibli D.J., Hunter H.N., Aseyev V., Starner T.D., Wiencek J.M., McCray P.B., Jr., Tack B.F., Vogel H.J.: The solution structures of the human β -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., 2002; 277: 8279–8289
- [56] Schibli D.J., Nguyen L.T., Kernaghan S.D., Rekdal O., Vogel H.J.: Structure-function analysis of tritriptin analogs: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle-bound NMR structures. Biophys. J., 2006; 91: 4413–4426
- [57] Schwartz E.N.: A review on the occurrence of bioactive compounds in amphibian skin secretion. Toxicon, 2000; 38: 500–501
- [58] Seto G.W., Marwaha S., Kobewka D.M., Lewis R.N., Separovic F., McElhaney R.N.: Interactions of the Australian tree frog antimicrobial peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with lipid model membranes: differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies. Biochim. Biophys. Acta, 2007; 1768: 2787–2800
- [59] Steinborner S.T., Waugh R.J., Bowie J.H., Wallace J.C., Tyler M.J., Ramsay S.L.: New caerin antibacterial peptides from the skin glands of the Australian tree frog *Litoria xanthomera*. J. Pept. Sci., 1997; 3: 181–185
- [60] Sumbatyan N.V., Gröger K., Chichenkov O.N., Korshunova G.A.: Synthesis and activity of dermorphin analogues containing unusual amino acid residues. Lett. Peptide Sci., 1997; 4: 477–480
- [61] Sura P.: Encyklopedia współczesnych płazów i gadów. Wyd. 2, Fundacja na Rzecz Miasta Nowego Sącza, 2005
- [62] Traynor J.R.: Epibatidine and pain. Br. J. Anaesth., 1998; 81: 69–76
- [63] Tyler M.J., Stone D.J., Bowie J.H.: A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 1992; 28: 199–200
- [64] Useiko A.B., Emel'ianova T.G., Miasoedov N.F.: Dermorphins are natural opioids with an unique primary structure that determines their biological specificity. Biol. Bull., 2002; 29: 154–164
- [65] VanCompernelle S.E., Taylor R.J., Oswald-Richter K., Jiang J., Youree B.E., Bowie J.H., Tyler M.J., Conlon J.M., Wade D., Aiken C., Dermody T.S., KewalRamani V.N., Rollins-Smith L.A., Unutmaz D.: Antimicrobial peptides from amphibian skin potentially inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. J. Virol., 2005; 79: 11598–11606
- [66] Vincler M.: Neuronal nicotinic receptors as targets for novel analgesics. Expert Opin. Investig. Drugs, 2005; 14: 1191–1198
- [67] Wang G.: Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. J. Biol. Chem., 2008; 283: 32637–32643
- [68] Wang S.Y., Tikhonov D.B., Mitchell J., Zhorov B.S., Wang G.K.: Irreversible block of cardiac mutant Na⁺ channels by batrachotoxin. Channels, 2007; 1: 179–188
- [69] Wegener K.L., Wabnitz P.A., Carver J.A., Bowie J.H., Chia B.C., Wallace J.C., Tyler M.J.: Host defence peptides from the skin glands of the Australian blue mountains tree-frog *Litoria citropa*. Solution structure of the antibacterial peptide citropin 1.1. Eur. J. Biochem., 1999; 265: 627–637
- [70] White R., Malpass J.R., Handa S., Richard Baker S., Broad L.M., Folly L., Mogg A.: Epibatidine isomers and analogues: structure-activity relationships. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006; 16: 5493–5497
- [71] Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Katedoliny i defensyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. Post. Hig. Med. Dosw., 2008; 62: 694–707
- [72] Wong H., Bowie J.H., Carver J.A.: The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. Eur. J. Biochem., 1997; 247: 545–557
- [73] Zhang C.X., Ge Z.M., Cheng T.M., Li R.T.: Synthesis and analgesic activity of secondary amine analogues of pyridylmethylamine and positional isomeric analogues of ABT-594. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006; 16: 2013–2016

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.