

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



Antimikrobiálne aktívne peptidy (rešerše)

Bakalárska práca

Vedúci bakalárskej práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Sofia Jarošová

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Pod'akovanie

Rada by som touto cestou poďakovala každému, kto nejakým spôsobom pomohol vzniku tejto práce, a to v prvom rade môjmu vedúcemu, doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., ktorý ma usmerňoval pri písaní a dôkladne sa venoval revízií mojej práce.

Práca bola podporená z prostriedkov projektov Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU a *Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NW24-05-00549*.

Abstrakt

Antimikrobiálne aktívne peptidy predstavujú jednu z veľkých nádejí vedeckej obce a pacientov na vyriešenie alebo aspoň čiastočnú elimináciu stále narastajúceho problému rezistencie na antibiotiká. Tento jav je poháňaný predovšetkým neadekvátnym užívaním antibiotík a môže vážne ovplyvniť liečbu množstva infekčných chorôb. Bližší náhľad na túto problematiku vrátane mechanizmov antibiotickej rezistencie je zhrnutý v úvode práce. Jedným z dôvodov, prečo sa antimikrobiálne aktívne peptidy považujú za perspektívne riešenie liečby infekčných bakteriálnych chorôb je fakt, že pracujú v „multi-hit“ móde, čo znamená, že jednotlivé druhy využívajú viac mechanizmov účinku. Pochopenie týchto mechanizmov je kľúčovým predpokladom rozvoja použitia peptidov. Náhrada antibiotík v liečbe infekčných chorôb nie je jediným perspektívnym využitím tejto skupiny peptidov. Z oblasti medicíny je snaha využiť ich aj v liečbe chorôb, ktoré sú spôsobené vírusmi, hubami alebo parazitmi.

Kľúčové slová

Antibiotiká, antimikrobiálne aktívne peptidy, mechanizmus účinku, rezistencia na antibiotiká

Abstract

Antimicrobial peptides represent a great hope for scientists in the effort to solve or at least partly eliminate the increasing problem of antibiotic resistance. This phenomenon, fuelled by inappropriate antibiotic use, could seriously influence the therapy of many infectious diseases. A closer look at the issue is offered in the introduction of this work. One of the reasons antimicrobial peptides are considered a prospective cure for infectious bacterial diseases is that they operate in a "multi-hit" mode, which means that individual species use more modes of action when they operate. More significant development of antimicrobial peptides is based on understanding those modes of action. Replacement of antibiotics to cure infectious diseases is not the only perspective use of this group of peptides. Focusing on their medicinal use, there is an effort to use them to cure diseases of viral, fungal, or parasitic origin. In other fields, they can find their application in agriculture, aquaculture, the food industry, or animal breeding.

Keywords

Antibiotic resistance, antibiotics, antimicrobial peptides , mechanism of action

Obsah

Aminokyselinové sekvencie vybraných peptidov	8
1. Úvod	11
1.1 Stručná história vývoja antibiotík	11
1.2 Delenie antibiotík na základe pôvodu	12
1.3 Vlastnosti ideálneho antibiotika.....	13
1.4 Vplyv antibiotík na mikroflóru	13
1.5 Mechanizmus fungovania antibiotík	15
1.5.1 Antibiotiká so schopnosťou narušiť bunecnú stenu	15
1.5.2 Antibiotiká schopné narušiť bunecnú membránu.....	15
1.5.3 Antibiotiká schopné ovplyvniť syntézu proteínov	15
1.5.4 Antibiotiká schopné narušovať syntézu nukleových kyselín.....	16
1.6 Rezistencia na antibiotiká	17
1.6.1 Príčiny antibiotickej rezistencie	17
1.6.2 Riešenia a následky odolnosti voči antibiotikám	19
1.6.3 Mechanizmy antibiotickej rezistencie	19
1.7 Zhrnutie problematiky antibiotickej rezistencie.....	21
2. Cieľ práce.....	22
3. Prehľad a vlastnosti antimikrobiálne aktívnych peptidov	23
3.1 Definícia a stručná charakteristika	23
3.2 Delenie AMP podľa pôvodu	23
3.3 Rozdelenie AMP podľa aktivity.....	25
3.3.1 AMP s antivírusovými účinkami.....	25
3.3.2 AMP s antibakteriálnymi účinkami	27
3.3.3 AMP s antimykotickými účinkami.....	29
3.3.4 AMP z účinkom proti parazitom	30
3.3.5 AMP s protinádorovými účinkami	31

3.4 Mechanizmy akcie antimikrobiálne aktívnych peptidov	32
3.4.1 AMP so schopnosťou priameho zabíjania.....	33
3.4.2 AMP schopné imunomodulácie.....	40
3.5 Environmentálne faktory ovplyvňujúce aktivitu antimikrobiálne aktívnych peptidov	42
3.5.1 Kovové ióny.....	42
3.5.2 pH.....	43
3.5.3 Proteázy	43
3.6 Expresia a regulácia AMP	44
3.6.1 Expresia AMP na koži.....	44
3.6.2 Expresia AMP v črevách.....	45
3.7 Design AMP	45
3.7.1 Použitie nanotechnológie v dizajne AMP	46
3.7.2 Chemické modifikácie.....	47
4. Záver.....	49
Zdroje použitej literatúry.....	50
Zdroje použitých obrázkov.....	55

Aminokyselinové sekvencie vybraných peptidov

Alameticíny	XPXAXAQXVXGLXPVXXQQX/XPXAXAQXVXGLXPVXXEQ X
Aureín 1.2	GLFDIIKKIAESF
APP	GLARALTRLLRQLTRQLTRA
Arenicín-1	RWCYAYVVRVGVLVRYRRCW
As-CATH4	RRGLFKKLRKIKKGFKKIFKRLPPVGVGVSIPLAGRR
Bac7 (1-35)	RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPGPRPIPRPLPFP
Beta-defenzín (QS-BD)	ASPAIWGCDSFLGYCRLACFARESSVGQKECAEGMLCCIPN VFGTFW
Bombinín-H1	IIGPVLGMVGSALGGLLKKI
Buforín II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK
Cekropín A	WKLFFKKILKVL
Cekropín B	RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVLGSAKAIGK
Citropín 1.2	GLFDIIKKVASVVGGL
D-g113k	GKIIKLGKASLKL
Dermaseptin- S9	GLRSKIWLWVLLMIWQESNKFKKM
Dicentracín	FLRSLRGAKAIYRGARAGWRG
Enfuvirtíd	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF
Epinecidín-1	GFIFHIIKGLFHAGKMIHGLV
Fyloseptín-2	FLSLIPHAINAVSTLVHFF
Gramicidín D	VGA1AvVvWIWIWIG
HBD-2 (36-41)	KCCCKP
HBD-3	DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
Hepcidín	GCRFCCNCCPNMSGCGVCCRF
Histatin 5	DSHAKRHHGYKRFHEKHHSRGGY
IDR-1018	VRLIVAVRIWRR
Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR
Jeleín-I	PFKLKLHL
Katelicidín-BF	KFFRKLKKS VKKRAKEFFKKPRVIGVSIPF
KR-12	KRIWQRIKDFLR

Lakticín Q	MAGFLKVVQLLAKYGSKAVQAWANKGKILDWLNAGQAID WVFSKIKQILGIK
Leap-2	MTPLWRVMGNKPFAYCQDHVECSTGICKGGHCSIYSQPIKS
LI-37	KEFKRIVQRIKDFLRNLV
Magainín-2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS
Melitín	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
Mersacidín	CxFxLPGGGGVCxLxXECIx
Nizín	IXSIXLCxPGCKxGALMGCNMKxAxCHCSIHVXK
NP-6	WFkXxFf
Pardaxín	GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGEQE
Piscidín	FFHHIFRGIVHVGKTIHKLVTG
Plasticin-TR	GLVSGLLNSVTGLLGNLAGGGL
PR-39	FFHHIFRGIVHVGKTIHKLVTG
Protegríny	RGGRLCYCRRRFCVVCV
Puroindoline-A (34-46)	FPVTWRWWKWWKG
Tanatín	GSKKPVPIIYCNRRRTGKQCQM
Teixobaktín	xISqiIStAXI

Poznámka: Jednotlivé aminokyselinové sekvencie sú uvedené na základe informácií z databázy „Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides“ (Prevzaté dňa 11.4.2024 zo stránky: <https://dbaasp.org/home>). V článkoch, z ktorých čerpá táto práca často nebolo presne uvedené, o ktorú formu peptidu sa jedná. Preto boli do tejto tabuľky zaradené aminokyselinové sekvencie najobecnejších verzií spomenutých peptidov.

Zoznam použitých skratiek

ACE-2	Angiotenzín-konvertujúci enzým 2
ACP	Antimikrobiálne aktívne peptidy používané na liečbu rakoviny
AMP	Antimikrobiálne aktívne peptidy
APD3	Antimicrobial Peptide Database
ATP	Adenozíntrifosfát
AVP	Antimikrobiálne aktívne peptidy s antivírusovým účinkom
DBAASP	Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
HBD	Ľudský beta-defenzín
HDP	„Host defense peptides“
HIV	Vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti
IDR	Vrodený obranný regulátor
IL-6	Interleukín 6
IL-10	Interleukín 10
LPS	Lipopolysacharid
LTA	Lipoteichoová kyselina
OSCC	Skvamózny orálny bunecný karcinóm
PBPs	Penicilín-viažúce proteíny
RNA	Ribonukleová kyselina
SARS-CoV-2	„Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2“
TNF-alfa	Tumor nekrotizujúci faktor alfa
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

1. Úvod

Antibiotiká sú produkty mikroorganizmov, syntetické deriváty alebo semisyntetické zlúčeniny, ktoré majú antimikróbne účinky. [23] Ich produkcia a využívanie sú považované za jeden z kľúčových faktorov predĺženia dĺžky života v dvadsiatom storočí. [26] Napriek tomu, že antimikróbne aktívne látky spôsobili revolúciu v medicíne, infekčné choroby stále zostávajú jednou z najčastejších príčin úmrtia v rozvinutých krajinách. Je to spôsobené predovšetkým výskytom nových chorôb a návratom chorôb, ktoré boli v minulosti rozšírené. [1]

Antibiotiká môžeme deliť na základe rôznych kritérií, jedným z nich je aj množstvo patogénov, proti ktorému sú účinné. [23] Môžu mať buď úzke spektrum účinku, čo znamená, že cieľia na malé množstvo druhov patogénov, alebo široké spektrum účinku, čo znamená, že zasiahnu väčšie množstvo druhov baktérií. Antibiotiká so širokým spektrom účinku sú často voľbou lekárov v prípade, že nie je určený konkrétny druh patogénu. Je teda vyššia pravdepodobnosť, že podaním antibiotika, ktoré má potenciál cieľiť na vyššie množstvo druhov patogénov, zasiahne aj rast daného neznámeho patogénu. Na druhej strane to ale môže viesť aj k neadekvátnemu užívaniu antibiotík, ak je zvolený nesprávny druh lieku, a tým pádom k podpore vzniku rezistencie na antibiotiká. Z pohľadu prevencie vzniku rezistencie je teda výhodnejšie používať antibiotiká z úzkym spektrom účinku, ktoré sa používajú predovšetkým, keď je patogén známy. [22]

1.1 Stručná história vývoja antibiotík

Používanie mikroorganizmov so schopnosťou produkovať antimikróbne aktívne látky sa datuje už do obdobia pred 2000 rokov. Písomné zmienky dokladajú, že na území Číny, Grécka, Srbska a Egypta sa prikladali kusy plesnivého chlebu na otvorené rany. [8]

Prvé vedomé pokusy o vynájdenie lieku proti infekciám sa pripisuje Paulovi Ehrlichovi. [42] Vynašiel liek menom Salvarsan, ktorý sa používa na liečbu syfilisu, pôsobí teda proti patogénu *Treponema pallidum*. Paul Ehrlich založil svoj výskum na používaní farbív za účelom selektívneho sfarbovania bakteriálnych buniek a jeho štýl práce sa považuje za jeden z prvých systematických výskumov na vývin liečiv.

Výskum na poli antibiotík pokračoval vývinom lieku na báze sulfonamidov s názvom Prontosil. Objavil ho Gerhard Domagk. Jeho snaha bola motivovaná rodinnými pomermi,

týmto liekom totiž zachránil ruku svojej dcéry pred amputáciou. Sulfonamidy, medzi ktoré radíme aj Prontosil, sa považujú za prvé efektívne a klinicky užívané antibiotiká. Používajú sa dodnes, no ich používanie sa obmedzilo po príchode penicilínu. [8]

Kým Prontosil a Salvarsan sú synteticky vytvorené liečivá, penicilín je prvé antibiotikum, ktoré vzniklo na báze prírodne vyskytujúcej sa látky. V roku 1928 Alexander Fleming pozoroval, že kolónie baktérie *Staphylococcus aureus* neboli schopné rasti po kontaminácii plesňou *Penicillium notatum*. Následne tento druh izoloval a skúmal. Zistil, že produkuje látku, ktorá je schopná zabiť patogény spôsobujúce mnohé rozšírené choroby. Táto látka bola následne purifikovaná a izolovaná. [42]

Penicilín má beta-laktamovú štruktúru, ktorá bola objavená Dorothy Hodgkinovou. Vyriešila sa tak vedecká dišputa, či má beta-laktamovú alebo thiazolidín-oxazolonovú štruktúru. Znalosť štruktúry penicilínu sa ukázala ako veľmi dôležitá, pretože umožňuje vývin semisyntetických derivátov, ktoré majú poslúžiť v boji proti antibiotickej rezistencii. [8] Poznáme dve skupiny penicilínov: prirodzene objavujúci sa a synteticky upravený. Rôzne formy sa používajú pri liečbe rôznych druhov chorôb. [35]

Po uvedení penicilínu do klinickej praxe nasledoval takzvaný „zlatý vek antibiotík“, ktorý ohraničujeme rokmi 1940 a 1960. Bol do veľkej miery podnietený výskumami Selmana Waksmana, ktorý objavil veľké množstvo látok s antibiotickým účinkom, medzi inými aj streptomycín, čo bol prvý liek proti tuberkulóze. [8]

Antibiotická rezistencia sa prvýkrát objavila v spojitosti s penicilínom, a to relatívne krátko po uvedení antibiotík na trh. Vedecká obec odpovedala na rezistenciu na antibiotiká uvedením nových druhov antibiotík, ktorých bol v tom čase veľký výber. No postupne sa objavovala rezistencia aj na ďalšie antibiotiká a zásoba nových druhov liekov sa minula. Tento nedostatok možností liečby sa naplno rozmohol v sedemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia a trpíme ním dodnes. [42]

1.2 Delenie antibiotík na základe pôvodu

Antibiotiká delíme na syntetické, semisyntetické a látky prírodného pôvodu. [7] Antibiotiká prírodného pôvodu sú pre ďalší vývoj považované za lepšiu možnosť než synteticky vytvorené antibiotiká, pretože ponúkajú originálnu štruktúru a vysokú efektívnosť. Väčšina antibiotík objavených v dvadsiatom storočí vzišla z výskumu baktérií objavujúcich sa

v pôde. Viac ako polovica antibiotík, ktoré vznikli v druhej polovici dvadsiateho storočia vzišla z rodu *Streptomyces*. Objavilo sa niekoľko teórií, ktoré sa pokúšali vysvetliť, prečo práve pôdne mikróby produkujú také množstvo prírodných antibiotík. Tou najpravdepodobnejšou je, že mikróby potrebujú antimikrobiálne aktívne látky na boj o pôdu a zdroje v nej a zároveň ich využívajú ako signálne molekuly na komunikáciu. [8]

1.3 Vlastnosti ideálneho antibiotika

Ako je už uvedené v úvode tejto práce, jednou z najväčších výhod antibiotika môže byť jeho vysoká selektivita, a to sa využíva v prípadoch, kedy je patogén jasne identifikovaný. [22] Medzi ďalšie dôležité vlastnosti patrí optimálna rozpustnosť v telesných tekutinách. Látka zároveň nesmie byť schopná metabolizovať sa skôr, než prejaví svoj účinok. To isté platí aj pre antibiotiká, ktoré sú podávané orálnou cestou, tam nesmie byť možná ani degradácia kyslým prostredím žalúdka. Podané antibiotikum by nemalo negatívne ovplyvňovať prirodzenú mikroflóru organizmu. [23] Tomuto aspektu sa budem podrobnejšie venovať v ďalších častiach tejto práce.

Zanedbať pri výskume nových druhov antibiotík nemôžeme ani alergie a rezistenciu. Antibiotiká by mali spôsobovať čo najmenej alergických reakcií a ideálne by nemali prispievať k vzniku rezistencie. [23] Medzi nežiadúce účinky radíme okrem alergickej reakcie napríklad aj horúčku, čo je jeden z najčastejších prejavov hypersenzitivity. Vyrážka ako nežiadany symptóm často sprevádza požitie antibiotík na báze beta-laktamov a v neposlednom rade fotosenzitivita, ktorou pacienti trpia pri expozícii ultrafialovému žiareniu. [7]

Medzi praktické aspekty vývinu antibiotika bezpochybne patrí aj životnosť samotného lieku a jeho nenáročnosť pri skladovaní. [23]

1.4 Vplyv antibiotík na mikroflóru

V predošlej časti som už okrajovo načrtla dôležitosť zachovania mikroflóry po pôsobení antimikróbne aktívnej látky. Veľmi vysoká dôležitosť sa pripisuje mikrobiote lokalizovanej v gastrointestinálnom trakte, ktorá je najčastejšie poškodzovaná antibiotikami so širokým spektrom účinku. [26] Tie totiž majú schopnosť eliminovať rast patogénu aj niektorých druhov, ktoré sú bežnou súčasťou zdravého gastrointestinálneho traktu. V zdravom

tráviacom trakte nájdeme eukaryoty, baktérie, vírusy aj archeony. [7] Toto prostredie sa vyznačuje veľkou diverzitou druhov, ktoré zabezpečujú vývoj a funkciu primárnej imunity a ochranu pred patogénmi. [33]

Obzvlášť vysoká pozornosť by sa mala venovať mikrobiote novorodencov, ktorú do značnej miery ovplyvňuje matka. Tá je hlavným zdrojom mikróbov do mikrobioty novorodenca. Žena, ktorá porodila takzvaným prirodzeným pôrodom, zásobí svoje dieťa rozmanitejším spektrom mikróbov podobným jej vaginálnej mikroflóre. Naproti tomu dieťa, ktoré prišlo na svet cisárskym rezom, bude mať črevnú mikroflóru obsahujúcu mikróby, ktoré sa nachádzajú v nemocnici a na koži matky. Vplyv na črevné prostredie má aj kojenie. Kojené deti majú v črevách vyššiu koncentráciu zástupcov rodu *Bifidobacterium*. Materské mlieko obsahuje oligosacharidy, ktoré sú utilizované práve baktériami tohto rodu. Ďalším dôležitým faktorom pre mikroflóru tráviaceho traktu novorodenca je aj potencionálne užívanie antibiotík počas tehotenstva. Zvýšené užívanie antibiotík môže negatívne ovplyvniť vaginálnu sliznicu matky, čo sa ukáže ako problém pri prirodzenom pôrode. Niektoré typy liekov môžu vytvoriť predispozíciu na alergie alebo astmu v dospelosti plodu, iné môžu dokonca podnecovať vznik obezity. Podoba črevnej mikroflóry sa ustáli medzi druhým a štvrtým rokom života. [26]

Narušenie mikrobioty gastrointestinálneho traktu antibiotikami zostáva zdravotným rizikom aj po finálnom ustálení. Mimo iné môže viesť ku Crohnovej chorobe, astme, obezite a diabetu. Črevná mikroflóra zabezpečuje aj zdravie črevnej steny. [33] Prostredie tráviaceho traktu nie je jediné, ktoré môže byť narušené liečbou antibiotikami. Častým prípadom je aj zmena kožnej mikroflóry. [2]

Nie všetky druhy antibiotík majú na mikroflóru negatívny vplyv. Čoraz častejšie sa predmetom výskumu stávajú takzvané „eubiotiká“. Tieto látky pôsobia antimikróbne, ale iba na niektoré druhy mikróbov, iné naopak stimulujú a tým podporujú prirodzené zloženie mikrobioty. Príkladom takéhoto lieku je nitrofurantoin, ktorý sa používa pri liečbe infekcií vylučovacieho systému, a zároveň má schopnosť podporiť rast druhov kmeňa *Actinobacteria*. Vplyv antibiotík na mikroflóru teda nemusí byť iba negatívny, no žiaľ, zatiaľ nemáme veľa antibiotík, ktoré by mikrobiotu pozitívne stimulovali. [7]

1.5 Mechanizmus fungovania antibiotík

Všetky antibiotiká zdieľajú spoločnú vlastnosť narúšať kľúčové vlastnosti bakteriálnych buniek, na ktoré cieľia. Na základe spôsobu, akým ovplyvnia chod bunky, ich delíme na štyri základné skupiny. Môžu narušiť syntézu bunečnej steny, narušiť bunečnú membránu, ovplyvniť syntézu bielkovín alebo ovplyvniť syntézu nukleových kyselín. [23]

1.5.1 Antibiotiká so schopnosťou narušiť bunečnú stenu

Do tejto skupiny najčastejšie zaraďujeme beta-laktamové antibiotiká, kam patrí ampicilín, penicilín-V aj penicilín-G, čo sú zástupcovia penicilínov, ale aj cefalosporíny, ďalej vankomycín alebo bacitracín. Kľúčovým faktorom tvorby bunečnej steny je takzvaný „cross-linking“, čo by sme mohli preložiť ako zosieťovanie. [43] Tento proces je určujúci pre pevnosť bunečnej steny. Bunečná stena je tvorená peptidoglykanmi. Peptidové reťazce sa predlžujú pomocou cukrov z polymérov a tvoria tak sieť peptidov. -D-alanyl-alanín potrebuje na zosieťovanie penicilín-viažúce proteíny (PBPs). Niektoré beta-laktamové antibiotiká cieľia práve na PBPs, ktoré vytvoria väzbu s beta-laktamom a nie sú teda ďalej schopné podieľať sa na syntéze peptidoglykanov. [1] Ďalším spôsobom môže byť napríklad vyviazanie enzýmu transpeptidázy cez serínové zvyšky. [23] Aj keď spôsoby narušenia procesu stavby bunečnej steny môžu byť rôzne, výsledok je rovnaký, a to, že bunečná stena je oslabená, tvar bunky je deformovaný, čo vyústi do smrti bunky. [43]

1.5.2 Antibiotiká schopné narušiť bunečnú membránu

Ku skupine antibiotík so schopnosťou narušiť bunečnú membránu radíme polymyxíny alebo polyény. Polymyxíny sa využívajú pri liečbe infikovaných rán a popálenín. Medzi polyény patrí amfotericín a nystatín. Sú to veľmi účinné antimykotiká. Rozrušujú fosfolipidy v membráne a zapríčinia vyliatie obsahu bunky do okolia. Tento druh antibiotík je často produkovaný predstaviteľmi druhu *Bacillus*. [23]

1.5.3 Antibiotiká schopné ovplyvniť syntézu proteínov

Antibiotiká ovplyvňujúce syntézu bielkovín majú zvyčajne široké spektrum účinku. Často zasahujú do procesu translácie a naviažu sa na jednu jednotku ribozómu, čím znemožnia jej pripojenie k druhej jednotke. [23] Translácia je proces tvorby reťazca aminokyselín s poradím udaným molekulou mRNA, ktorá vznikla pri transkripcii prepisom z DNA. Syntéza proteínov je katalyzovaná cytoplazmatickými faktormi a ribozómami. [1] Ribozóm

eukaryotickej bunky má 80S, zatiaľ čo ribozóm prokaryotickej bunky má 70S. Majú teda aj rozdielne jednotky. [23] Bakteriálny ribozóm sa skladá z jednotiek 50S a 30S .

Jednotku 30S sú schopné inhibovať aminoglykosidy. Tito pozitívne nabité častice sa pripoja k vonkajšej membráne nesúcej negatívny náboj a vytvoria póry, ktoré umožnia vstup antibiotika do baktérie. Cielia na ribozómy, musia teda prejsť aj cez cytoplazmatickú membránu. Využíva sa aktívny transportný mechanizmus závislý, okrem iného, na kyslíku. Preto sa aminoglykosidy nepredpisujú v prítomnosti anaeróbných baktérií. Ich funkciu ale podporujú lieky, ktoré inhibujú stavbu bunecnej steny, pretože uľahčujú penetráciu aj pri malej dávke aminoglykosidu. Po úspešnom vstupe sa naväzuje na 30S podjednotku a spôsobuje predčasné ukončenie translácie či nesprávne čítanie mRNA. [1] Na jednotku 50S cieľi chloramfenikol a erythromycín. Obe sa viažu takým spôsobom, že zabraňujú väzbe aminokyselín do reťazcov. Chloramfenikol je, okrem iného, známy tým, že bol prvým antibiotikom so širokým spektrom účinku. Pôvodne sa získaval z prírodných zdrojov, teraz sa vyrába synteticky. [23]

1.5.4 Antibiotiká schopné narúšať syntézu nukleových kyselín

Do poslednej skupiny antibiotík so schopnosťou narúšať syntézu nukleových kyselín radíme rifamycíny. Majú schopnosť inhibovať enzým RNA polymerázu, čím zamedzia produkcii mRNA. Napríklad rifampicín sa používa na liečbu tuberkulózy. Má rozvinutú schopnosť penetrácie tkanív, čo z neho robí veľmi vhodný liek. [23] Ďalšími zástupcami sú sulfonamidy, ktoré radíme medzi kompetitívne inhibítory syntézy kyseliny listovej. Zastavia produkciu folátu vďaka tomu, že majú podobnú štruktúru ako *para*-aminobenzoová kyselina, ktorá je prekursorom kyseliny listovej. Obe látky na základe svojej podobnosti súperia o enzým katalyzujúci tvorbu folátu. [30]

Medzi ďalších významných zástupcov patria chinolóny. Majú schopnosť inhibovať topoizomerázu, najčastejšie je to topoizomeráza II. Tento enzým je kľúčovým faktorom v replikácii DNA, zabezpečuje „rozmotanie“ nadskrutkovicového vinutia DNA. Topoizomerázy sú prítomné v eukaryotických aj prokaryotických bunkách. Platí však, že chinolóny sú špecifickými inhibítormi bakteriálnej topoizomerázy II. Fluorochinolóny, zástupcovia druhej generácie chinolónov, sú aktívne proti gram-pozitívnym aj gram-negatívnym baktériám. Medzi konkrétnych zástupcov radíme levofloxacín, norfloxacín alebo ciprofloxacín. [41]

1.6 Rezistencia na antibiotiká

Antibiotická rezistencia je považovaná za jednu z najväčších súčasných výziev a prekážok v boji proti infekčným chorobám. [23] Na začiatok je dôležité povedať, že nie človek sa stáva rezistentným, je to baktéria, ktorá následne môže človeka infikovať a spôsobiť tak ťažšie vyliečiteľnú infekciu. [3] Jej vznik bol predpokladaný už Alexandrom Flemingom, [23] ide totiž o veľmi logický úkaz, ktorý je zapríčinený snahou patogénu zmierniť letálny účinok antimikróbne aktívnej látky.

Odolnosť voči antibiotikám môže byť buď vrodená, alebo získaná. Baktérie s vrodenu rezistenciou môžu mať gén nesúci rezistenciu takpovediac aktívny už od „narodenia“ alebo daný gén môže byť v organizme prítomný s tým, že sa prejaví až po liečbe antibiotikami. Na druhej strane baktérie so získanou rezistenciou ju väčšinou dostanú ako výsledok mutácie vlastnej chromozomálnej DNA, translácie, konjugácie alebo transpozície. [4] Proces získania rezistencie od inej baktérie konjugáciou je veľmi rýchly, a preto spôsobuje najviac problémov s rezistenciou voči antibiotikám. [23] Ďalej sa budeme zameriavať predovšetkým na získanú rezistenciu.

Rezistenciu na aspoň jeden druh antibiotika vykazuje až 70 % všetkých známych patogénov. [4] Najväčšou obavou vedeckej komunity je, že ak sa nenájde spôsob boja proti antibiotickej rezistencii, zdravotný systém sa pomyselne vráti do doby pred objavom antibiotík, pretože známe antibiotiká už na patogény nebudú mať vplyv. [6]

Už teraz sa objavuje čoraz viac infekcií, ktoré, vďaka zníženej efektívite antibiotík, nevieme tak jednoducho vyliečiť. Je to napríklad tuberkulóza, sepsa, zápal pľúc a iné. [3] V súčasnosti umrie v Indii dieťa každých deväť minút na infekciu spôsobenú patogénom s antibiotickou rezistenciou. [4] Rezistenciu na antibiotiká môžeme pozorovať u kohokoľvek bez rozdielu veku alebo pôvodu. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) považuje tento problém za jednu z najväčších hrozieb verejného zdravia, potravinovej bezpečnosti a rozvoja. Platí, že v častiach sveta, kde je prístup k antibiotikám prakticky bez regulácie, sa prejavuje tento jav najintenzívnejšie. [3]

1.6.1 Príčiny antibiotickej rezistencie

Hlavné dôvody výskytu rezistencie vyplývajú z nesprávneho užívania antibiotík. Problém často začína už v ordináciách, kde môže byť nesprávne určená diagnóza. Antibiotiká nie sú účinné proti vírusom, a tak, keď je infekcii pripisovaný bakteriálny pôvod namiesto vírusového, dochádza k zbytočnému užívaniu týchto liekov, čo podporí rozvoj rezistencie. [4]

Komplikácie môže spôsobiť aj svojvoľné užívanie antibiotík zo strany pacienta. Je to bežné v krajinách, kde nie je prísna regulácia výdaja antibiotík. Tento prístup môže nielen podporiť vznik rezistencie, ale môže budiť aj mylné znanie, že prebieha liečba, čo často vyústí do neskorého začiatku adekvátnej a efektívnej liečby ochorenia. [4]

Rezistenciu podporí aj nesprávne užívanie alebo nadužívanie antibiotík. Pacient nedokončí priebeh liečby antibiotikami, v dôsledku čoho niektoré baktérie prežijú a vybudujú si odolnosť. Už Alexander Fleming vydal prvé verejné varovanie týkajúce sa nadužívania antibiotík, pretože si uvedomil riziká spojené s takýmto správaním. [4]

Svoj podiel viny na rozvoji tohto fenoménu majú aj farmaceutické spoločnosti, ktoré nevenujú adekvátne množstvo financií a pozornosti výskumu nových antibiotík. [6] 82% všetkých schválených antibiotík bolo vyvinutých a schválených pred rokom 2000. Navyše pri výskume antibiotík zotrvali už iba štyri veľké farmaceutické firmy. Zvyšné významné farmaceutické podniky sa rozhodli cieľiť svoju pozornosť na výskum výnosnejších druhov liekov. [32] Výroba antibiotík je menej ekonomicky atraktívna než produkcia iných liekov, pretože terapia má väčšinou krátky priebeh a *lege artis* by ich kúpa nemala byť taká častá.

Problém spočíva aj v prístupe lekárov, ktorí uprednostnia lieky, na ktoré sú zvyknutí, a nové antibiotiká si nechajú iba ako zálohu alebo na liečbu infekcií, s ktorými si najpoužívanejšie antibiotiká neporadia. To síce oddiali vznik rezistencie na tieto málo užívané antibiotiká, ale pôsobí to ako demotivujúci faktor pre ďalší výskum z ekonomického hľadiska. [6]

Antibiotickú rezistenciu ovplyvňuje aj spôsob chovu zvierat určených na konzumáciu. Antibiotiká sú častou prísadou rastových výživových doplnkov napríklad hydiny, u ktorej sa tiež môže objaviť rezistencia na antibiotiká. Keď sa takto chované zviera skonzumuje, rezistencia sa môže preniesť na konzumenta. [4]

Tieto javy vyústia do zmien v rámci baktérie. Častá je genetická mutácia, počas bakteriálnej replikácie môže dôjsť k zmene v niekoľkých pároch báz. Väčšina génov pre rezistenciu sa prenáša pomocou plazmidov. Rozvoju v neposlednom rade napomáha aj selektívny tlak, ktorý môžeme charakterizovať ako environmentálne podmienky, ktoré umožnia vznik a rozvoj jedincov s novo vzniknutou vlastnosťou. [4] Je to práve neadekvátne užívanie antibiotík, ktoré tento selektívny tlak vytvorilo. [6]

1.6.2 Riešenia a následky odolnosti voči antibiotikám

Medzi najzávažnejšie dôsledky patrí predĺženie doby ochorenia, ktoré často musí byť liečené v nemocnici, tým pádom nevyhnutne dochádza k predraženiu zdravotnej starostlivosti, čo sa dotýka spoločnosti ako celku, ale aj samotného pacienta. Zároveň aj transplantácie a operácie sa stávajú nebezpečnejšími v dôsledku nedostatku efektívnych antibiotík. [3]

Jedným z nových prístupov v boji s antibiotickou rezistenciou je využitie génového sekvenovania vo výrobe nových liekov. Táto metóda ponúka rýchlu a efektívnu identifikáciu rezistencie a jej mechanizmu. [4]

Štúdie ukázali, že existuje korelácia medzi antibiotickou rezistenciou a frekvenciou užívania rovnakých druhov antibiotík, teda homogenitou. Pacienti, ktorí užívajú určitý druh antibiotika opakovane, majú štatisticky častejšie problémy s odolnosťou voči antibiotikám. To nás znovu vracia k problematike výskumu nových antibiotík. [5]

Ďalšou sľubnou modernou technikou je využívanie bakteriofágov namiesto antibiotík. Ukazujú sa ako efektívnejšie než antibiotiká a majú aj tú výhodu, že nepoškodzujú mikroflóru gastrointestinálneho traktu. [4]

V poslednom čase sa ukazuje aj snaha o rýchlejšiu diagnostiku. Často sa stáva, že pacient dostane antibiotiká so širokým spektrom účinku ešte pred identifikáciou prítomného patogénu. Výsledkom toho je, že pacient začne brať neefektívne lieky a po výsledkoch testu začne brať adekvátne antibiotiká, čo značne predlžuje dobu užívania antibiotík ako takých. Keby sa zrýchlil proces identifikácie prítomného patogénu, bola by šanca zamedziť zbytočnému užívaniu neefektívnych liekov a zároveň by sa aj skrátil priebeh liečby. [5]

Z pohľadu každodennej praxe je pre urýchlenie riešenia problematiky antibiotickej rezistencie dôležité v prvom rade zamedziť prenosu rezistentných druhov patogénov. Preto je dôležité znížiť incidencia infekcií očkovaním, umývaním rúk, hygienou stravovania a dodržiavaním zásad bezpečného sexu. Venovať sa informovanosti v tejto téme a podporovať výskum. A v neposlednom rade uviesť do praxe adekvátne užívanie antibiotík. [3] To sa týka nielen správneho výberu antibiotík, ale aj dĺžky terapie. [5]

1.6.3 Mechanizmy antibiotickej rezistencie

Poznáme štyri hlavné mechanizmy, ktorými baktérie odolávajú účinku antibiotík:

1. Zabránenie vstupu do bunky
2. Modifikácia miesta, na ktoré cieľ antibiotikum

3. Inaktivácia lieku

4. Vypudenie lieku

Gram-negatívne baktérie sú prirodzene menej priepustné pre určité druhy antibiotík než gram-pozitívne baktérie. Vo svojej vonkajšej membráne majú lipopolysacharidovú (LPS) vrstvu, ktorá tvorí pomyselný štít. Jedným z praktických príkladov je nefunkčnosť glykopeptidových antibiotík, ktorých zástupcom je napríklad vankomycín, proti gram-negatívnym baktériám. Ich vonkajšia membrána je natoľko dobrou ochranou, že glykopeptidy nie sú schopné penetrácie. Ale nie je to len LPS vrstva, ktorá bráni prieniku antibiotika do baktérie. Obranou je aj matrix biofilmu, ktorý je bohatý na polysacharidy, proteíny a DNA. Ten poskytuje ochranu gram-pozitívnym aj gram-negatívnym baktériám. [4]

Niektoré baktérie sú prirodzene odolné voči určitým druhom antibiotík, pretože neobsahujú jednotky, na ktoré antibiotikum cieľi. Jedným z najznámejších príkladov je odolnosť rodu *Mycoplasma* voči penicilínu. Penicilín cieľi na peptidoglykan, ktorý rod *Mycoplasma* nemá. [23]

Tento mechanizmus sa ale nevzťahuje iba na vrodenu rezistenciu. Častým javom je aj modifikácia usporiadania alebo množstva penicilín-viažucich proteínov. To zmení citlivosť na beta-laktamové lieky. [4] Rezistencia *Staphylococcus aureus* na oxacilín a methicilín, ale aj odolnosť *Streptococcus pneumoniae* voči penicilínu funguje na tomto princípe.

Medzi iné spôsoby patrí napríklad alterácia v 30S alebo 50S ribozomálnej podjednotke. Dochádza pri tom aj k ovplyvneniu syntézy bielkovín. Možná je aj mutácia DNA gyrázy a topoizomerázy IV, ktorá zabraňuje väzbe k antibiotiku. [1]

Inaktivácia antibiotika môže nastať buď degradáciou lieku, alebo zmenou jeho chemickej štruktúry. Baktérie tvoria enzýmy so schopnosťou pripájať rôzne skupiny k antibiotiku, a tak zabrániť naviazaniu sa na cieľovú časť baktérie. Najčastejším a najefektívnejším je viazanie fosforylového, acetylového alebo adenylového zvyšku. Najtypickejším príkladom je modifikácia aminoglykosidov adenyláciou a fosforyláciou. Aminoglykosid-modifikujúce enzýmy kovalentne zmenia hydroxylové alebo amino skupiny a tým inaktivujú molekulu. [4]

Najčastejšie využívané antibiotiká sú zo skupiny beta-laktamov. Vyznačujú sa štvorčlennou beta-laktamovou slučkou. Beta-laktamáza túto slučku ruší, čo zničí molekulu beta-laktamu. [23]

Posledným mechanizmom je vypudenie lieku z bunky baktérie. Základom tohto spôsobu je využívanie efluxových púmp, ktoré zachovávajú nízku koncentráciu antibiotika v tele baktérie. Pumpy odvádzajú antimikrobiálne aktívnu látku z bunky rovnakou rýchlosťou, ako do nej látka vstupuje. To vytvorí rovnováhu a zabráni to antibiotiku dostať sa k cieľovej časti bunky. Pumpy sa nachádzajú v cytoplazmatickej membráne, môžu byť špecifické alebo môžu prenášať viac druhov antibiotík, čo je častejší prípad. [1]

1.7 Zhrnutie problematiky antibiotickej rezistencie

Mnohé roky stagnácie v oblasti riešenia rezistencie na antibiotiká vyústili do alarmujúcej situácie, ktorá môže, v najhoršom prípade, skončiť nástupom „post-antibiotickej“ éry. [29] To by bol stav, v ktorom by sa roky výskumu antibiotík stali prakticky bezvýznamnými, pretože antibiotiká by už na väčšinu patogénov neúčinkovali. Dobrou správou je, že sa začala vyvíjať snaha, z radov vedcov, politikov aj zdravotníkov, takémuto scenáru zabrániť. [6] Existuje niekoľko prostriedkov, ktorými môžeme proti tomuto problému bojovať. Dôležitým opatrením je adekvátne predpisovanie antibiotík. Pri liečbe infekcií dýchacích ciest sa spotrebuje veľká časť antibiotík, väčšina zbytočne. Je to zapríčinené výnosnosťou produkcie antibiotík namierených na liečbu respiračných infekcií. Pravdou ale zostáva, že využitie antibiotík pri tomto druhu infekcií nie je vždy nutné. Ďalším riešením je vývoj nových očkovacích látok, ktoré by mohli znížiť dopyt po antibiotikách. [38] Dôraz sa kladie aj na informovanosť ľudí, ktorí sa môžu, dodržiavaním základných hygienických návykov, chrániť pred mnohými chorobami a vyhnúť sa tak, adekvátnemu aj neadekvátnemu, užívaniu antibiotík. [3] Krokom dopredu v boji proti rezistenciám je aj vývoj nových a vylepšovanie už objavených antibiotík. [6] Objavenie nových antibiotík sa však stáva stále náročnejšou úlohou. [34] Priestor preto dostávajú aj inovatívnejšie terapeutické možnosti. Nádej v riešení problému predstavujú aj antimikrobiálne aktívne peptidy (AMP), ktoré sú objektom narastajúceho záujmu vedcov v posledných rokoch. [15] Predpokladá sa, že majú malú náchylnosť na vývoj rezistencie, a zároveň majú široké spektrum antimikrobiálnej aktivity, čo z nich robí veľmi výhodné terapeutické prostriedky, ktoré by mohli zvrátiť boj s antibiotickou rezistenciou v náš prospech. [40]

2. Cieľ práce

Cieľom tejto rešersnej bakalárskej práce je poskytnúť globálny náhľad do problematiky antimikrobiálne aktívnych peptidov s použitím dostupných poznatkov. V rámci komplexnej charakteristiky AMP nemožno opomenúť základné vlastnosti, delenie na základe pôvodu ani expresiu a jej reguláciu. Ambíciou tejto práce je presnejšie popísať rôzne aktivity AMP s prihliadnutím predovšetkým na využitie vo farmácii a medicíne. Schopnosť uplatniť tieto schopnosti v praxi je pevne prepojená s pochopením mechanizmov akcie. Preto bude jednotlivým princípom venovaná samostatná kapitola.

3. Prehľad a vlastnosti antimikrobiálne aktívnych peptidov

3.1 Definícia a stručná charakteristika

AMP sú skupina peptidov s veľmi častým výskytom v prírode a sú neoddeliteľnou súčasťou vrodeného imunitného systému. [15] K roku 2022 bolo známych 3324 zástupcov. Najväčší rozpuk vo výskume nastal v deväťdesiatych rokoch 20. storočia, kedy bolo nahlásených viac ako 300 nových AMP. Odvtedy boli zaznamenané a charakterizované v širokom spektre organizmov. [17] Predstavujú časť prvej obrannej línie organizmu po vniknutí patogénu. [14] Ukázalo sa, že táto skupina peptidov je účinná proti baktériám, hubám, parazitom a aj vírusom. [15] Najčastejšie sa skúma ich účinok voči gram-negatívnym a gram-pozitívnym baktériám. [18] V niektorých štúdiách sa hovorí aj o účinnosti v liečbe rakoviny. [34] Na druhej strane aj baktérie si môžu tvoriť vlastné peptidy, aby ochránili svoju ekologickú nikú. [10] Predpokladá sa, že by antimikrobiálne aktívne peptidy mohli nahradiť antibiotiká na poli medicíny, agrikultúry, akvakultúry, stravovania a chovu zvierat. Ich výskum sa systematicky zaoberá mechanizmami účinku, klasifikáciou, mechanizmom dizajnu a environmentálnymi faktormi. Záujem o ich bližšie preskúmanie bol podnietený snahou o boj proti antibiotickej rezistencii, no v neposlednom rade aj pandémiou vírusu Covid-19, ktorá si vyžiadala urýchlený vývin nových liekov. [15]

Antimikrobiálne peptidy majú 10-60 aminokyselín. [14] Priemerne to vychádza na 33,26 aminokyseliny na jeden peptid. [15] Kľúčovú úlohu v aktivite zohráva ich amfifilný charakter, inak povedané prítomnosť hydrofilnej aj hydrofóbnej časti. Táto vlastnosť umožňuje ľahké vniknutie do bunecnej membrány alebo prienik do cytosolu. [14, 17] Zvyčajne sú antimikrobiálne aktívne peptidy nabité pozitívne, sú teda kationické, no máme aj niekoľko negatívne nabitých zástupcov. [15]

3.2 Delenie AMP podľa pôvodu

Antimikrobiálne aktívne peptidy môžeme deliť na základe viacerých kritérií, jedným z nich je aj pôvod. Databáza peptidov obsahuje zástupcov zo všetkých ríš. [17]

Medzi zástupcov cicavcov, u ktorých môžeme nájsť antimikrobiálne aktívne peptidy, radíme ľudí, ovce a iné. Najčastejšie sa u cicavcov vyskytujú defenzíny a katelicidíny. [15] Radíme ich do skupiny takzvaných „host defense peptides“ (HDP), čo sú peptidy produkované rôznymi bunkami, ktoré spája dôležitá úloha v odpovedi organizmu na infekciu a zápal.

Skúma sa aj ich vplyv na udržanie mikrobioty organizmu a ich potenciálne využitie v liečbe. [37] V každej fáze života organizmu majú inú expresiu. Napríklad katelicidín LL-37 býva detekovaný na koži novorodencov, naproti tomu expresia beta-defenzínu sa uskutočňuje až vo vysokom veku. HDP nájdeme na rôznych častiach tela, napríklad na koži, očiach, ušiach, pľúcach, črevách a podobne. Nemalú úlohu zohrávajú peptidy aj v kojení. Prítomnosť antimikrobiálne aktívnych peptidov v materskom mlieku znižuje úmrtnosť novorodencov. [15]

Ďalšou skupinou sú obojživelníci. Antimikrobiálne peptidy hrajú dôležitú úlohu pri ochrane proti patogénom. Najbohatšie zastúpenie AMP je u žiab. Najznámejším peptidom je magainín, ktorý je vylučovaný niektorými druhmi žiab cez kožu. [15] Kožné žľazy sú významným zdrojom antimikrobiálnych peptidov v organizme obojživelníkov. Okrem magainínu nájdeme na koži žiab aj citropín, bombinín a plasticín.

U hmyzu nájdeme najširší rozsah antimikrobiálne aktívnych peptidov. [17] Každý druh produkuje iné druhy AMP. Sú syntetizované v telách a krvných bunkách hmyzu. Množstvo tvorených peptidov je jedným z faktorov vysokej schopnosti adaptácie, ktorá napomáha hmyzu prežiť. Najznámejšími zástupcami sú cekropíny. Nájdeme ich napríklad v organizmoch včiel alebo octomiliiek. Cekropín A je účinný proti rakovine alebo zápalovým ochoreniam. [15]

Antimikrobiálne aktívne peptidy hrajú určujúcu rolu v živote morských bezstavovcov, pretože nemajú adaptívny imunitný systém. [17] Morským zdrojom AMP sa v poslednom čase začal pripisovať väčší význam. Väčšina peptidov s morským pôvodom bola zatiaľ otestovaná iba *in vitro*, no ukazujú sa už aj prvé výsledky testovania *in vivo*. Napríklad As-CATH4 vykazuje imunostimulačné účinky na živých organizmoch, má potenciál podporiť schopnosť lieku potlačiť infekcie. [15]

U vtákov boli detekované tri hlavné skupiny antimikrobiálne aktívnych peptidov: katelicidíny, beta-defenzíny a LEAP-2. Ten je známy aj ako pečeňou exprimovaný antimikrobiálny peptid 2. [17]

Ryby používajú AMP ako obranu pred chorobami. U rýb môžeme nájsť napríklad hepcidín, piscidín alebo dicentracín. [17]

Antimikrobiálne aktívne peptidy sú produkované baktériami v snahe o udržanie svojho životného priestoru a nutrientov. Chránia sa tak pred inými mikroorganizmami v svojom

životnom prostredí. [17] Vzhľadom na vysoké náklady pri tvorbe AMP syntetickou cestou, je snaha využívať schopnosť baktérií tvoriť antimikrobiálne aktívne peptidy. Využíva sa napríklad *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* a iné. Nutno podotknúť, že využívanie *Escherichia coli* na tento účel je sporné, pretože vykazuje komplikácie spojené s toxicitou, proteolytickou degradáciou a purifikáciou. Medzi známých zástupcov AMP tvorených mikroorganizmami patria nizín a gramicidín, sú produktami druhov *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus brevis*. [15]

Rastliny majú schopnosť produkovať dvanásť rodín antimikrobiálne aktívnych peptidov. [17] Môžu byť extrahované a izolované zo stonky, semienok a aj listov rastlín. [15] Tioníny získavame zo semien, kvetín a listov, no defenzíny iba zo semien. [17]

3.3 Rozdelenie AMP podľa aktivity

Antimikróbne aktívne peptidy sa v rámci databázy APD3 delia do 18 skupín, ktoré môžeme zhrnúť do šiestich veľkých skupín na základe aktivity AMP. Sú to peptidy účinné proti vírom, baktériám, hubám, parazitom, nádorom a špeciálne sa účinky AMP skúmajú aj v spojitosti s vírusom HIV. [15]

3.3.1 AMP s antivírusovými účinkami

Vzhľadom na rastúcu rezistenciu vírusov na bežné lieky a obmedzený účinok týchto liekov v terapiách sa AMP s antivírusovým účinkom stávajú veľmi dôležitými. Označujeme ich aj AVP, teda peptidy s antivírusovým účinkom. [14] Vírusy majú potenciál spôsobiť veľké straty v oblasti ekonomiky, chovu dobytku, ale aj ľudských životov. Ukázalo sa to aj počas nedávnej pandémie Covid-19. [15]

Koronavírusy sú rodinou vírusov so schopnosťou infikovať zvieratá a spôsobiť respiračné problémy ľuďom. Covid-19 je infekčná choroba, ktorá bola prvýkrát zaznamenaná v Číne v roku 2019. Je spôsobená vírusom SARS-CoV-2. Na túto chorobu zomrelo 5,5 milióna ľudí po celom svete, a preto sa ukázala potreba vynájsť efektívnu protivírusovú liečbu na potlačenie tohto ochorenia. Je pravda, že už máme vyvinuté vakcíny proti koronavírusu, tie sa aplikujú v rámci prevencie. Naproti tomu antivirotiká sú potrebné ako forma pomoci pre už infikovaných pacientov. [17]

Spomedzi 3224, v roku 2022, známých antimikrobiálne aktívnych peptidov má 190 AMP antivírusovú aktivitu a ich potenciálne využitie v liečbe Covid-19 sa ukazuje veľmi sľubne,

pretože majú inhibičné efekty na už známe proteiny SARS-CoV-2 vírusu. Jedným z príkladov skúmaných antimikrobiálnych bielkovín je brilacidín. Ukazuje sa, že má silnú antivírusovú aktivitu proti SARS-CoV-2 v testoch *in vitro*. Iné antivírusovo aktívne peptidy majú preventívny potenciál. Peptid dermaseprín-S9 by mohol znemožniť naviazanie spike proteínu vírusu SARS-CoV-2 na povrch receptora ACE-2. [17] Doposiaľ nám chýbajú rozsiahlejšie klinické testy. Hlavnou metódou experimentov na zvieratách je podanie cez nosovú dutinu, čo je pravdepodobný potenciálny spôsob podania budúceho lieku na báze AMP. [15]

Covid-19 nie je jediné vírusové ochorenie, ktoré môže byť potlačené antimikrobiálne aktívnymi peptidmi. Štúdie ukazujú sľubné výsledky aj v boji s HIV, chrípkou, herpesom alebo hepatitídou B. [34]

Antivírusovo aktívne peptidy fungujú na rôznych bázach. Môžu zablockovať naviazanie na povrchový receptor hostiteľskej bunky, priamo interagovať s vírusom, inhibovať replikáciu vírusu alebo zabrániť fúzií vírusu s hostiteľskou bunkou. [17] Častým spôsobom je aj zničenie obalu vírusu. Napríklad epinecidín-1 sprostredkúva inaktiváciu vírusových častíc a vykazuje vysokú mieru inhibície vírusových ochorení úst a chodidiel. [15] Na druhej strane antivírusové peptidy s účinkom proti vírusu chrípky majú schopnosť regulovať imunitný systém človeka a zvýšiť expresiu cytokínov a chemokínov, aktivovať bunky imunitného systému a deaktivovať samotný patogén. [14]

3.3.1.1 AMP s účinkom proti HIV

Human immunodeficiency virus, alebo skrátene HIV, je chronická choroba, ktorá si vyžaduje celoživotnú terapiu. [21] K roku 2022 bolo infikovaných viac než 39 miliónov ľudí. [24] Rozlišujeme dva druhy HIV, a to HIV-1 a HIV-2. Oba druhy majú rozdielnú vývojovú históriu a zdieľajú iba 50 % genetických znakov. [20]

Súčasnú antivírusovú liečbu podávanú pri infekcii HIV sa zameriavajú na štyri časti vírusového cyklu: vstup vírusu do bunky, reverzná transkripcia, integrácia a nakoniec maturácia virionu. Ako bolo spomenuté, HIV-1 a HIV-2 sú veľmi rozdielne. To je dôvodom, prečo známa antivírusová liečba nepôsobí na oba druhy rovnako. Dnes známe prípravky nie je možné využívať pri nákaze vírusom HIV-2. Aj to je jedným z dôvodov, prečo je veľký dopyt po výskume nových liekov na HIV. V poslednej dobe sa viacero štúdií zameralo na fúzne inhibičné molekuly, hlavne tie, ktoré cieľia na glykoproteín na vírusovej obálke s názvom gp41. Ten hrá významnú rolu vo vstupe vírusu do hostiteľskej bunky. [20]

Najdôležitejšie zatiaľ objavené peptidy s účinkom proti HIV sú defenzíny, kam patrí alfa-defenzín aj beta-defenzín (oba majú iný mechanizmus účinku), LL-37, gramicidín D, magainín 2 a iné. Peptid enfuvirtíd je účinnou zložkou komerčne dostupného lieku proti HIV. [15]

Veľmi často sa HIV objavuje v kombinácii s tuberkulózou. Ľudia s touto kombináciou diagnóz musia brať veľké množstvo liekov, čo prináša rôzne komplikácie. Okrem iného napríklad problémy s mentálnym zdravím, finančnú záťaž, časovú náročnosť zvládnutia liečby, ale aj liekmi vyvolanú chorobu pečene. Problémom je výber vhodných liekov. WHO zverejnila údaj, že až pol milióna ľudí má rezistenciu na rifampicín, čo je veľmi často používané liečivo pri liečbe tuberkulózy. Objavuje sa potreba nových liekov, ktorá by mohla byť vyriešená práve antimikrobiálne aktívnymi peptidmi. Dôkladnejšie preskúmanie mechanizmu účinku AMP by malo napomôcť odkryť ich terapeutický potenciál v celej šírke. [21]

3.3.2 AMP s antibakteriálnymi účinkami

Prvotným cieľom vo výskume peptidov s antimikrobiálnou aktivitou bol boj proti vzrastajúcej rezistencii na antibiotiká. Niektorí vedci v tom videli takú mieru dôležitosti, že navrhovali, aby sa antimikrobiálne aktívne peptidy nazývali antibakteriálne aktívne peptidy. [14]

AMP majú širšie spektrum účinku než klasické antibiotiká. Sú účinné proti gram-pozitívnym aj gram-negatívnym baktériám. Ukazuje sa, že fungujú aj ako podporná liečba pri užívaní antibiotík a niektoré majú dokonca schopnosť rozšíriť spektrum účinnosti antibiotík pri užívaní v kombinácii. [34]

Antimikrobiálne aktívne peptidy majú vysoký inhibičný efekt na bežné patogény ako *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* a iné. [15] Predpokladá sa, že budú mať veľký význam aj v zefektívnení liečby rán. V ranách sú skoro vždy prítomné mikróby, dochádza totiž k vystaveniu kompromitovanej kožnej bariéry vonkajším podmienkam. Chronické rany sú definované neschopnosťou tkaniva získať kontrolu nad situáciou pomocou zápalu, imunitnej odpovede a vnútorného mechanizmu mikrobiálneho zabíjania. Tento stav je väčšinou podporený defektmi v metabolickej kontrole, slabou lymfatickou a arteriovenóznou cirkuláciou, narušenou inerváciou a formáciou rezistentného mikrobiálneho biofilmu. Tieto ťažko liečiteľné rany predstavujú ideálny cieľ pre AMP so širokým spektrom aktivity proti mikróbov a schopnosťami ovplyvniť imunitu. Bunky

aktívne v hojení rán majú schopnosť produkovať AMP a modifikovať tak proces hojenia rán a zabíjanie mikrobov. Príkladom je peptid D-GL13K, ktorý funguje na infekcie popálenín, alebo polypeptid Pep 19 2.5 využiteľný pri liečbe neinfikovaných rán a rán infikovaných *Staphylococcus aureus*. [11]

Antimikrobiálne aktívne peptidy majú vplyv na biofilm vo všetkých štádiách jeho vývinu. Robia to viacerými spôsobmi. Môžu zastaviť formáciu biofilmu tak, že narušia signalizačnú dráhu baktérií. Ďalej majú schopnosť obmedziť expresiu génov potrebných na vytvorenie bakteriálneho biofilmu. Často podporujú baktérie v tvorbe guanozín-tetrafosfátu a pentafosfátu. Tým pádom sú obmedzené zásoby nutrientov, čo vyústi do zastavenia syntézy nukleových kyselín. Ale môžu aj zničiť už existujúci biofilm zmenou membránového potenciálu baktérie. [14]

Najčastejším mechanizmom účinku AMP v spojení s baktériami je narušenie bunečnej steny a plazmatickej membrány baktérie. Vytvoria sa iontové kanály alebo póry, ktoré vedú k zvýšenej priepustnosti membrány, čo končí vyliatím obsahu bunky a smrťou baktérie. [34] Existujú aj iné spôsoby ovplyvnenia baktérií antimikrobiálne aktívnymi peptidmi. Je to napríklad zabránenie tvorby bunečnej steny. AMP sa naviaže na lipid II, ten je súčasťou molekuly peptidoglykanu a kľúčovým faktorom syntézy bunečnej steny. Mnohé peptidy majú schopnosť narušiť intracelulárne funkcie do takej miery, až zabijú baktériu. Je to napríklad inhibícia syntézy DNA, RNA a bielkovín. Ďalším spôsobom môže byť zničenie už existujúcej bunečnej steny. AMP môžu pôsobiť na membránu viacerými spôsobmi. Vzniká buď transmembránový model póru v tvare barelu, alebo v tvare prstenca. Oba druhy pórov sú tvorené peptidovými aj lipidovými skupinami. Rozdiel je v tom, že model s pórom v tvare barelu si zachováva hydrofóbne a hydrofilné dvojvrstvy nedotknuté. Je známy ešte kobercový model. Pri ňom sa netvoria póry. Dochádza k prilnutiu antibakteriálne aktívneho peptidu k bakteriálnej membráne a postupnému prieniku, až kým nie je dosiahnutá určitá koncentrácia, ktorá vyústi do straty integrity a otvorení bunky. Výskum ukázal, že peptidy zvyčajne nefungujú na základe mechanizmu jedného modelu, ale že sú modely u jednotlivých peptidov kombinované. [14]

Dobrá inhibičnú aktivitu vo vzťahu ku gram-negatívnym a gram-pozitívnym baktériám ukázali napríklad peptidy nizín a niektoré defenzíny. [15] Rodina katelicidínov vykazuje mimoriadne vysoké spektrum účinku. Je aktívna proti gram-pozitívnym, gram-negatívnym baktériám, hubám, vírusom aj prvokom. V porovnaní s defenzínmi majú katelicidíny silnejšiu antibakteriálnu aktivitu. Majú zároveň rapidný baktéricídny účinok na mnoho silno

rezistentných baktérií. Majú potenciál v liečbe zápalov a infekcií, majú vysoký potenciál aj pri liečbe sepsy a dermatitídy. [34]

3.3.3 AMP s antimykotickými účinkami

Nadmerné a neadekvátne užívanie systémových antibiotík, imunosupresívna liečba, chemoterapia a rádioterapia navýšili množstvo infekcií s hubovým pôvodom v populácii. Podpora vývinu nových antimykotík je nutná kvôli nízkemu počtu známych antimykotík a zvyšujúcej sa rezistencií určitých druhov na dostupné antimykotiká. Tieto javy vedú k zvýšenej morbidite a mortalite, no zároveň podporujú snahy na poli výskumu. [14] Mnoho peptidov s antimykotickou aktivitou je účinných proti bežným hubovým patogénom, ako sú *Aspergillus sp.* alebo *Candida albicans*. [15]

Peptidy s antimykotickými účinkami môžeme deliť podľa viacerých kritérií, časté je delenie podľa pôvodu na prírodné, syntetické a semisyntetické. Prírodné sú tvorené eukaryotmi, baktériami a archeónmi. Semisyntetické a syntetické peptidy sú navrhnuté tak, aby sa vyznačovali výhodnými farmaceutickými vlastnosťami, znižovali imunogenicitu a ďalšie vedľajšie účinky. Vlastnosti ako náboj, stereošpecificita, hydrofobicita, sekundárna štruktúra a iné určujú antimykotickú aktivitu peptidu. Napríklad zvýšená hydrofobicita zvyšuje antimykotickú aktivitu. [14]

Antimykoticky aktívne antimikrobiálne peptidy môžu útočiť buď na intracelulárne komponenty, alebo na integritu bunecnej membrány huby. Existuje niekoľko mechanizmov účinku zahŕňajúcich priame narušenie membrány, inhibíciu tvorby bunecnej steny alebo interakciu s hubovými mitochondriami. Rodina echinokandínov inhibuje 1,3-beta-glukan syntázu, čo je enzým kľúčový pre stabilitu bunecnej steny. Blokáciou tohto enzýmu je bunecná stena destabilizovaná a bunka sa stáva zraniteľnou voči osmotickému tlaku. Beta-glukan syntázu nájdeme u druhov rodu *Aspergillus*, *Cryptococcus* a *Candida*. [18]

Aflatoxín produkovaný *Aspergillus flavus* je pre ľudský organizmus veľmi škodlivý. Negatívne dopady aflatoxínu môžu byť zneutralizované aj antimykotickými peptidmi. *Lactobacillus plantarum* slúži ako zdroj peptidov s antimykotickými účinkami, a to hlavne proti druhu *Aspergillus flavus*. Bolo z neho izolovaných až 37 antimykotických peptidov, ich kombinácia by mohla redukovať množstvo *A. flavus* v čerstvých kukuričných semenách. [15]

Ale aj výskum v boji proti iným hubám napreduje. Jedným príkladom za všetky je peptid AurH1 derivovaný z aureínu 1.2, ktorý môže liečiť infekcie spôsobené *Candida albicans*. [15]

3.3.4 AMP z účinkom proti parazitom

Parazity sú veľmi rozmanitou skupinou živočíchov. Radíme sem prvoky, ale aj červy. Sú príčinou mnohých veľmi závažných ochorení. WHO zaradila 11 chorôb s parazitickým pôvodom medzi takzvané „prehliadané“ tropické choroby. Medzi najvýznamnejšie radíme maláriu, leishmaniózu, trypanosomiázu a schistozomiázu. [19] Táto skupina je prítomná predovšetkým v tropických oblastiach, kde postihuje predovšetkým chudobné komunity, ženy a deti. Choroby, ktoré do tejto skupiny zaraďujeme, spôsobujú enormné následky v oblastiach zdravia, ekonomiky a sociálnej sféry. [31]

Choroby s parazitickým pôvodom sa môžu prenášať rôznymi cestami: zo zvierat'a na človeka, z človeka na človeka, vodou, pôdou a jedlom. So vzrastajúcou rezistenciou na známe lieky proti parazitom vzrastá aj potreba výskumu novej liečby. [15]

Antimikrobiálne aktívne peptidy ukazujú veľký potenciál liečby leishmaniózy. Toto ochorenie je spôsobené prvokom, prenáša sa hmyzím uhryznutím. *Phlebotombus* je rod hmyzu, ktorý slúži ako prenášač. Choroba sa vyskytuje v najchudobnejších častiach sveta. Spája sa s malnutríciou, zlými životnými podmienkami a oslabeným imunitným systémom. Existujú tri hlavné formy tohto ochorenia. Najčastejšia je kožná forma, tvoria sa pri nej vredy, ďalej poznáme viscerálnu formu, tá je najzávažnejšia a môže skončiť smrťou. Poslednou formou je mukokutánná forma, ktorá postihuje ústa, nos a krk. Problém predstavuje aj spojenie leishmaniózy s vírusom HIV. Táto kombinácia je spojená so silným vypuknutím choroby, častými relapsmi a vysokou mortalitou. [27]

AMP účinné proti leishmanióze boli nájdené vo viacerých živočíchoch, napríklad haliktín-2, ktorý bol extrahovaný z jedu včiel. Ten vykazuje dobrý účinok proti leishamóze a nemá žiadnu hemolytickú aktivitu vo vzťahu k ľudským červeným krvinkám. Výsledky sa ukazujú aj u cekropínu, defenzínov a attacínov, ktoré sú prenášané druhom *Lutzomyia longipalpis*. Tie sú aktívne pri infekciách spôsobených konkrétnym druhom *Leishmania infantum chagasi*. [19]

V nedávnych výskumoch sa našiel aj AMP, ktorý by mohol fungovať proti *Trichomonas vaginalis*. Je to Epi-1 a má schopnosť zničiť membránu tohto parazita. [15] Ďalej peptid

fyloseptín-2 získaný z žaby *Phyllomedusa azurea* má vysokú antiparazitickú aktivitu a potenciál zabrániť skříženej rezistencií vďaka svojej vhodnej chemickej štruktúre. [19]

3.3.5 AMP s protinádorovými účinkami

Rakovina je jednou z hlavných príčin úmrtia súčasnosti. Vzniká premenou zdravých buniek na nádorové bunky, ktoré prerastajú aj za hranice svojho prirodzeného miesta a tvoria tak nádorovú hmotu. Tieto bunky majú schopnosť osídľovať aj iné časti tela, tento proces nazývame metastáza. Rakovina sa najčastejšie lieči chemoterapiou, čo je veľmi agresívny druh terapie, ktorý má za cieľ zničiť rýchlo rastúce bunky. [36] Objavuje sa však potreba alternatívnej liečby, v prvom rade kvôli rezistenciám nádoru na chemoterapiu, [17] ale aj kvôli nízkej selektivitě a viacnásobnej rezistenciám na lieky. [36]

Niektoré peptidy majú schopnosť ničiť nádorové bunky. Táto vlastnosť môže byť následne vystupňovaná vhodnou chemickou modifikáciou. Antimikrobiálne aktívne peptidy používané na liečbu rakoviny majú skratku ACP. Tieto peptidy majú mnoho výhod. Radíme tam napríklad malý vzrast, vysokú aktivitu, špecificitu, afinitu, nízku reaktivitu s inými liekmi alebo schopnosť prejsť cez membrány. Dôležitý je aj fakt, že sa neukladajú v dôležitých orgánoch ľudského organizmu, ako sú napríklad obličky alebo pečeň, čo znižuje ich toxické vedľajšie účinky. Nemalou výhodou je aj ich jednoduchá výroba a modifikácia. [36]

Peptidy s protinádorovým účinkom môžu fungovať niekoľkými spôsobmi. Môžu využiť bunky imunitného systému na zabitie nádorových buniek, indukovať nekrózu alebo apoptózu nádorových buniek, zastaviť angiogézu s cieľom eliminovať výživu nádoru, jeho transkripciu, transláciu a metastázovanie. [15] Kľúčovú rolu v optimalizácii protinádorovej aktivity hrá náboj a hydrofobicita. Udržiavanie ich rovnováhy je pre maximalizáciu schopností eliminovať nádor určujúce. [18]

V nedávnej dobe bolo objavené veľké množstvo peptidov s protinádorovým účinkom. Radí sa tam napríklad indolicidín alebo puroindolín A. [15] Ďalej bakteriocín vykazuje cytotoxické efekty voči viacerým druhom nádorov u ľudí. Cekropín B je peptid účinný proti rakovine žalúdka, pľúc a proti leukémiám. [19]

Povrch nádorových buniek, je na rozdiel od zdravých normálnych buniek anionický, čo podnecuje účinok AMP. Jeden peptid môže pôsobiť na rôzne bunky rozdielnymi spôsobmi. Napríklad LL-37 je jediný z rodiny katelicidínov v tele človeka. Má schopnosť inhibovať rozvoj rakoviny hrubého čreva a rakoviny žalúdka. Na druhej strane môže podporiť vznik

a rozvoj rakoviny prsníkov, vaječníkov, pľúc, prostaty, pankreasu a tvorbu malígneho melanómu. Napríklad pri rakovine prsníkov LL-37 napomáha migrácií a metastázovaniu rakovinových buniek. V prípade rakoviny vaječníkov zas zlepšuje proliferáciu, migráciu a inváziu nádorových buniek vaječníkov. Aktivita podporujúca vznik nádoru je v prípade peptidu LL-37 sprostredkovaná imunomoduláciou. [19]

Nielen peptidy z rodiny katelicidínov majú tento dvojsečný účinok, aj v rodine defenzínov nájdeme zástupcov vykazujúcich podobné správanie. U pacientov s metastázujúcim nádorom hrubého čreva sa našli zvýšené hladiny peptidov HNP1-3. Na druhej strane sa ukázala aj protinádorová aktivita HNP1-3. HNP1 inhibuje rast nádoru pľúcneho adenokarcinomu, hrubého čreva a zabraňuje rakovine prsníkov. Tieto výsledky dosahuje vyvolávaním apoptózy, redukovaním angiogenézy a sprostredkúvaním protinádorovej imunity. [19]

Existuje aj snaha využiť antimikrobiálne aktívne peptidy ako markery pri diagnostike niektorých druhov nádorov. Testovali peptidy skupiny hBD v diagnostike skvamózneho orálneho bunečného karcinómu (OSCC). OSCC je orofaciálny karcinóm vyrastajúci z povrchu sliznice ústnej dutiny. Vzniká v dôsledku častého užívania tabaku a alkoholu. Jeho diagnostika nie je jednoduchá, využívajú sa hlavne histologické vyšetrenia. Táto choroba je potencionálne smrteľná, časté sú metastázy a nepredvídateľný rozsah bujnenia. Ukazuje sa, že v začiatkových štádiách rozvoja tohto karcinómu je markantne zvýšená expresia hBD-3, pričom expresia hBD-2 je paradoxne znížená. Problémom je, že zvýšená hladina hBD-3 sa nevyskytuje iba pri OSCC, tento jav sa vyskytuje aj pri skvamóznom nosohltanovom bunečnom karcinóme a je spojený aj s metastázami v oblasti lymfatických uzlín. Využitie slín na diagnostiku OSCC by spôsobilo prelom v diagnostike, no ukázalo sa, že peptidy skupiny hBD by ponúkali príliš vysokú variabilitu interpretácie. Takýto test by teda nebol dosť efektívny. Napriek tomu vo vedeckej obci naďalej pretrváva snaha využívať na diagnostiku rakoviny telesné tekutiny, ktoré sa môžu získať neinvazívnou cestou. [25]

3.4 Mechanizmy akcie antimikrobiálne aktívnych peptidov

Informácie o spôsobe, akým antimikrobiálne aktívne peptidy reagujú s mikroorganizmami, sú kľúčové pre vylepšovanie štruktúry a ďalší vývoj peptidov. Ukazuje sa, že AMP majú úplne iný mechanizmus akcie než antibiotiká užívané v súčasnej dobe na liečbu infekcií. [14] Štúdie navyše ukázali, že antimikrobiálne aktívne peptidy fungujú v „multi-hit“ móde.

To znamená, že sú schopné vykazovať viac než jeden mechanizmus účinku, pričom tieto mechanizmy môžu fungovať nezávisle od seba alebo sa môžu vzájomne dopĺňovať. Táto vlastnosť je ďalším významným faktorom pre použitie vo farmaceutickom priemysle. [16]

Je nutné podotknúť, že nepoznáme mechanizmus účinku každého známeho peptidu. Valná väčšina štúdií (predovšetkým v prípade peptidov, ktoré cieľia na membránu) sa robí na umelých lipidových membránach, ktorých zloženie a štruktúra vykazuje určité odlišnosti oproti bakteriálnej bunecnej membráne. Rovnako tak je rozdiel aj v raste mikroorganizmov v experimentálnych podmienkach a v organizme. To indikuje, že sa ešte môžu objaviť isté odchýlky od rozpoznaných mechanizmov pri použití antimikrobiálne aktívnych peptidov *in vivo*. [34]

Mechanizmy účinku môžu byť rozdelené do dvoch veľkých kategórií: peptidy so schopnosťou priameho zabíjania a peptidy s imunomodulačnou funkciou. Prvá spomenutá skupina sa ešte ďalej delí na peptidy cieľiace na membránu a peptidy, ktoré necieľia na membránu. [18]

3.4.1 AMP so schopnosťou priameho zabíjania

3.4.1.1 AMP cieľiace na membránu

Zvýšenie permeability bakteriálnej membrány je považované za široko akceptovaný mechanizmus. Spočíva v tom, že antimikrobiálne aktívne peptidy zničia membránové štruktúry baktérie (prípadne je to možné uplatniť aj v nádorových bunkách), čo vyústí do masívneho úniku bunecného obsahu a eventuálne do smrti. [34]

Antimikrobiálne aktívne peptidy sa pripoja elektrostatickými a hydrofóbnymi väzbami na negatívne nabitú membránu, ako je napríklad vonkajšia bakteriálna lipidová membrána, ktorá môže obsahovať fosfatidylglycerol alebo kardiolipin ako nositeľov záporného náboja. Toto spojenie je možné vďaka tomu, že AMP majú štruktúru s pozitívnym nábojom na povrchu. Táto ich vlastnosť je kľúčová v schopnosti zabíjania mikróbov. [18]

Antimikrobiálne aktívne peptidy nemajú schopnosť tvoriť silné väzby s eukaryotickými bunkami. [16] Tie sú zvyčajne neutrálne a obsahujú nenabitú fosfolipidy, sfingomyelíny a v poslednom rade cholesterol, ktorý všeobecne znižuje schopnosť AMP viazať sa na bunecné membrány. [18] To však neznamená, že eukaryotické bunky nemajú negatívne nabitú hlavičku lipidov v membráne. Sú však otočené smerom do cytoplazmy a nie do prostredia, AMP s týmito časticami teda nemôžu tvoriť väzby. [16]

Existujú dva spôsoby, ktorými môžu antimikrobiálne aktívne peptidy útočiť na bunecnú membránu a porušiť ju. Prvý spôsob je sprostredkovaný receptorom a druhý spôsob funguje bez receptoru. [36]

3.4.1.1.1 AMP využívajúce receptory

Mechanizmus využívajúci receptory je využívaný menšou skupinou AMP. Sú to väčšinou peptidy vytvorené baktériami, vírusmi a nádorovými bunkami. Príkladmi sú napríklad nizín, mersacidín alebo PR-39. [18]

Nizín je peptid vykazujúci antimikrobiálnu aktivitu už za pomerne nízkych koncentrácií. Najefektívnejší je proti gram-pozitívnym organizmom. Tvorí väzbu s lipidom II, ktorý plní úlohu receptoru a je zakotvený v membráne, kde sa zúčastňuje syntézy peptidoglykanu. Lipid II je zároveň významným prekurzorom v tvorbe bunecnej steny. To je dôvod, prečo je nizín taký účinný práve proti gram-pozitívnym baktériám. Ich prirodzenou charakteristikou je prítomnosť peptidoglykanov v bunecnej stene. Zvyčajne má tento peptid dve hlavné časti: prvá sa viaže veľmi ochotne na lipid II a druhá je póry-formujúca doména zakotvená v membráne. [18]

Mersacidín tiež účinkuje prostredníctvom lipidu II. Medzi účinkom nizínu a mersacidínu sú však isté rozdiely, aj keď funkciu receptoru plní v oboch prípadoch tá istá molekula. Na rozdiel od nizínu mersacidín útočí rovno na funkciu lipidu II a spôsobuje narušenie transglykozylácie a syntézy peptidoglykanov. Spoločnou charakteristikou oboch peptidov zostáva fakt, že cieľia na gram-pozitívne baktérie. [18]

PR-39 je ďalším príkladom peptidu, ktorý radíme medzi AMP schopné priameho zabitia pomocou využitia receptoru. V tomto prípade je využívaný membránový receptor SbmA. PR-39 nie je schopný tvoriť póry na bakteriálnej membráne, no má veľa iných užitočných aktivít, medzi ktoré patrí podpora degenerácie niektorých proteínov zahrnutých v replikácii DNA, ale aj zasahovanie do syntézy bielkovín a DNA pomocou navodenia proteolytickej aktivity. [18]

3.4.1.1.2 AMP nevyžívajúce receptory

Táto skupina antimikrobiálne aktívnych peptidov sa zvyčajne prirodzene nachádza u stavovcov aj bezstavovcov. Povrch membrány gram-pozitívnych baktérií aj gram-negatívnych baktérií má záporný náboj, ktorý umožňuje antimikrobiálne aktívnym peptidom

interakciu. Zvýšenie permeability membrány je najčastejším mechanizmom pôsobenia antimikrobiálne aktívnych peptidov. [34]

Mechanizmus zničenia bunky prostredníctvom bunečnej membrány má dva kroky. Prvým je naviazanie AMP na negatívne nabitú bakteriálnu membránu. [34] Väzba je sprostredkovaná elektrostatickými a hydrofóbnymi väzbami vďaka pozitívnemu náboju na povrchu antimikrobiálne aktívnych peptidov. [18] Potom nasleduje samotné zabitie bunky, to môže nastať dvojako: buď môže dôjsť k perforácii bunečnej membrány alebo môže nastať zničenie bez perforácie. Smrť bunky v prípade, kedy nenastane perforácia, je podmienená zabránením fyziologických procesov bunky, ako je DNA replikácia, RNA transkripcia alebo syntéza proteínov. Antimikrobiálne aktívny peptid má schopnosť zabrániť týmto procesom pomocou samotného naviazania sa na povrch bunky. [34]

Membrány gram-pozitívnych aj gram-negatívnych baktérií majú vo svojej stavbe niekoľko rozdielov. Preto v oboch skupinách evidujeme iné častice, ktoré umožnia peptidom prienik. [18]

Gram-negatívne baktérie majú na bunečnej membráne záporne nabité LPS, ktoré umožnia antimikrobiálne aktívnym peptidom vytvoriť zlom alebo dutinu vo vonkajšej membráne baktérie, proces je urýchlený výmenou horečnatých a vápenatých iontov pripojených k LPS. [18]

Na druhej strane gram-pozitívne baktérie majú tuhý matrix zabezpečujúci pevnosť bakteriálneho povrchu. Je tvorený peptidoglykanmi a lipoteichoovou kyselinou (LTA), ktoré sú obsiahnuté v bakteriálnej stene. Antimikrobiálne aktívne peptidy sú schopné difundovať cez póry vo vrstve peptidoglykanov. Svoju úlohu má ale aj LTA, je to veľmi dôležitý komponent bunečnej steny gram-pozitívnych baktérií pri interakcii s AMP. Môže podporiť reakciu medzi LTA a AMP tým, že poskytne ďalšie miesto, kam sa peptidy môžu naviazať. [18]

Po tom, čo AMP prejde cez vonkajšiu časť membrány gram-pozitívnych aj gram-negatívnych baktérií, peptidy sa naviažu na fosfolipidy obsiahnuté vo vnútornej časti bunečnej membrány, čím spôsobujú tvorbu dutiny, ktorá zapríčiní vyliatie bunečného obsahu do okolia. [18]

3.4.1.1.2.1 Modely

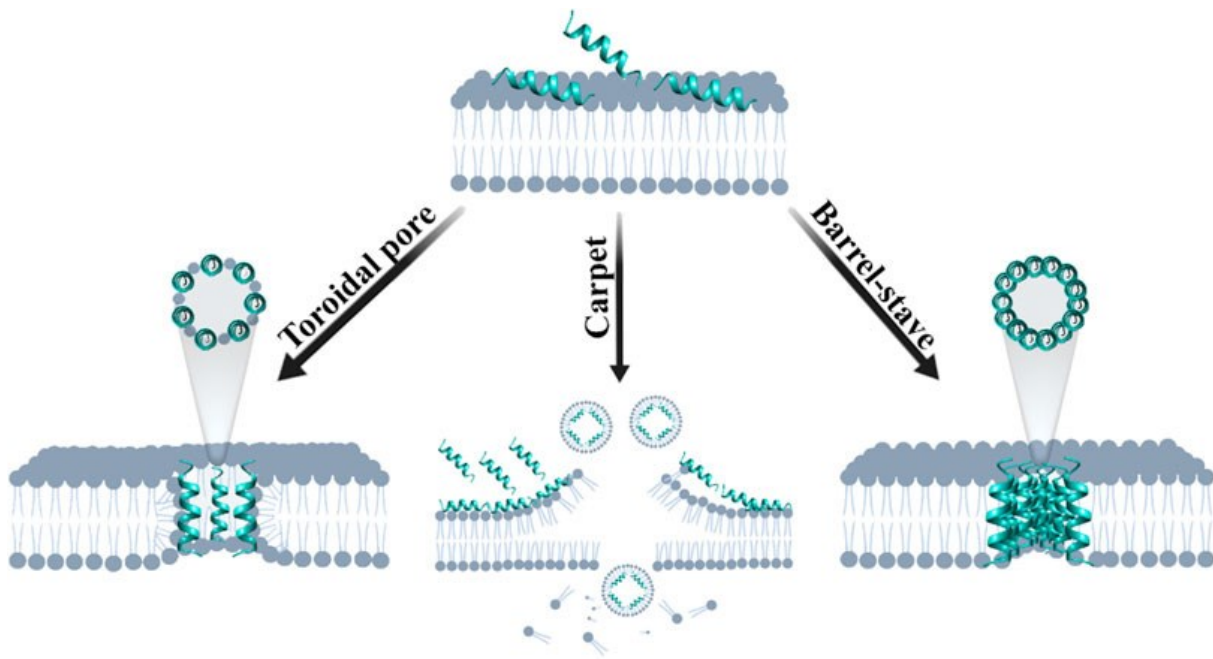
Mechanizmy sú popísané niekoľkými modelmi. Najčastejšie spomínanými modelmi sú kobercový model a modely, v ktorých sa tvoria póry, kam radíme model s toroidnými pórmí a sudovo-tyčovitý model. [15] Všetky tri budú teraz popísané a zároveň aj názorne graficky zobrazené na Obrázku 1.

Kobercový model je obsírne študovaný model, ktorý dokazuje, že antimikrobiálne aktívne peptidy sú schopné destabilizovať membránu aj bez tvorby špecifických pórov. [18] Mechanizmus tohto modelu v istom momente pripomína aktivitu detergentov. [36] Prvý krok spočíva v tom, že pozitívne nabité antimikrobiálne aktívne peptidy sa pripoja na negatívne nabitú fosfolipidovú membránu, orientované sú paralelne ku lipidovej dvojvrstve. Pokračuje to, až kým peptidy nedosiahnu kritickú koncentráciu a nevytvoria „koberec“ na membráne. Ten spôsobí pre bunku nežiadané väzbové interakcie na vonkajšej strane membrány, ktoré vyústia do ruptúry membrány. [18] Finálny krok, v ktorom sa z membrány vytvoria micely, sa nazýva aj detergenčný model, pretože kopíruje aktivitu detergentov. Kobercový model nevyžaduje špecifické interakcie medzi monomérmi peptidov naviazanými na membráne. Tak isto nie je potrebné formovať špecifické kanály alebo peptidové štruktúry. [16] Medzi príklady peptidov kopírujúcich tento mechanizmus radíme napríklad LL-37. Má štruktúru beta-skladaného listu, čo je dôležitým faktorom v prípade tohto modelu. [15] Ďalšími zástupcami sú napríklad niektoré cekropíny a indolicidíny alebo aureín 1.2. [16]

Sudovo-tyčovitý model patrí medzi modely, u ktorých dochádza k tvorbe pórov. Najprv sú antimikrobiálne aktívne peptidy umiestňujú na povrch membrány, pričom začnú vznikať laterálne interakcie medzi jednotlivými peptidmi. [36] Monoméry peptidov tvoria agregát. [18] Ďalším krokom je vertikálny prienik do membrány. [36] Ten môže nastať, až keď sa zhromaždí dostatočné množstvo peptidov, a to vďaka elektrostatickým väzbám medzi AMP a membránou, ktoré zabezpečia zmenu konformácie peptidov. Táto zmena spôsobí nadobudnutie amfifilného charakteru, ktorý je podmienkou tvorby póru. Keď koncentrácia peptidov dosiahne kritickú hodnotu, vznikne pór v tvare súdku. Odkaz na tvar tyče je v názve tohto modelu kvôli útvarom pripomínajúcim brvná v stenách póru. Tento mechanizmus je z veľkej časti založený na nadobudnutom amfifilnom charaktere antimikrobiálne aktívnych peptidov. Hydrofóbne zvyšky peptidov smerujú k lipofilným zvyškom v membráne, čiže dovnútra membrány. Hydrofilné zvyšky sú nasmerované dovnútra póru, čím tvoria vodný transmembránový kanál umožňujúci vypudenie obsahu bunky a následnú smrť bunky. [18]

Príklady peptidov, ktoré operujú podľa tohto modelu, sú alameticíny, pardaxín alebo protegríny. [36]

Toroidný model, pripomínajúci aj červiu dieru, zdieľa veľa podobností so sudovo-tyčovitým modelom. [18] V oboch modeloch dochádza ku kolmému prieniku do lipidovej dvojvrstvy, no v tomto prípade chýbajú špecifické interakcie medzi peptidmi. Pri toroidnom modeli peptidy tvoria zakrivenie v lipidovej dvojvrstve a vytvoria póry čiastočne z peptidov a čiastočne z fosfolipidových hlavičiek. [16] Peptidy sa najprv pripoja k membráne a podstúpia analogické štrukturálne modifikácie, aké podstúpili peptidy v sudovo-tyčovitom modeli. Lipofilné časti peptidov sú pripojené k oblasti hlavičiek fosfolipidov, dôjde k premiesteniu. To vytvorí trhlinu v hydrofóbnej časti membrány. Membrána je namáhaná, stenčuje sa a jej povrch sa stáva citlivým voči antimikrobiálne aktívnym peptidom. Keď je dosiahnutá kritická koncentrácia peptidov, vytvoria agregát a z neho toroidný pór, ktorý preniká kolmo do membrány. [18] Jeho stena je tvorená peptidmi aj skupinami fosfolipidových hlavičiek. [36] Pór je široký 1-2 nm. [34] Toroidný model nezachováva usporiadanie hydrofilnej a hydrofóbnej dvojvrstvy tak, ako je to v prípade sudovo-tyčovitého modelu. Rozrušenie tohto usporiadania poskytuje alternatívny priestor na interakciu s časťami lipidov. [16] Peptidy stále tvoria interakcie s oblasťou hlavičiek fosfolipidov, ale nie sú lokalizované v hydrofóbnej časti membrány, čo tvorí významný rozdiel medzi týmto modelom a sudovo-tyčovitým modelom. Príkladmi peptidov, ktoré fungujú na základe tohto mechanizmu, sú magainín 2, lacticín Q a melittín. [18]



Obrázok [1]: Schematické zobrazenie modelov. Ľavá šípka ukazuje toroidný model, stredná šípka kobercový model a pravá šípka sudovo-tyčovitý model

Tieto tri popisované modely fungujú bez účasti ATP. Naproti tomu makropinocytózový model závisí od ATP. Spočíva v tom, že plazmatická membrána cieľovej bunky sa vsunie do bunky spolu s peptidom a vytvorí tak makropinozóm. AMP sa dostane do bunky, vypudí sa z vaku a začne svoje antimikrobiálne pôsobenie. Ďalšími modelmi sú model elektroporézy a model potápajúcej sa plte. V týchto modeloch sa na membráne objavia nestabilné diery, ktoré sprostredkujú zmenu náboja na oboch stranách membrány, čo vyústi do prehlbovania dier. [18] Okrem týchto modelov existuje aj pomerne veľké množstvo iných, nie tak často využívaných modelov. Napríklad Shau-Huang-Matsuzukiho model alebo model medzifázovej aktivity. [16]

S modelmi sa spája veľa rôznych teórií, jednou z nich je, že kobercový model by mohol byť prekursorom toroidného modelu. Je pravdou, že zatiaľ bolo testované iba malé množstvo peptidov na reálnej bakteriálnej bunke, väčšina sa testuje na modelových membránach. Preto sa predpokladá, že pri iných experimentálnych podmienkach by mohli byť získané iné výsledky v spojitosti s mechanizmom účinku. [16]

3.4.1.2 AMP necieliace na membránu

Skupina peptidov, ktorá necieli svoju aktivitu na membrány, je považovaná za aktívnejšiu a silnejšiu skupinu, pretože demonštruje duálny mechanizmus účinku. Nielenže prejde cez bunecnú membránu, ale aj naruší chod fyziologických pochodov bunky. [34] AMP prekonajú membránu penetráciou alebo endocytózou. Po preniknutí do cytoplazmy sa

naviažu na svoj cieľ. Štruktúra, na ktoré peptidy cielia, môže byť niekoľko. Nasledujúca kapitola bude venovaná najvýznamnejším zástupcom. [15]

Prvou skupinou sú AMP s potenciálom inhibovať syntézu proteínov. Antimikrobiálne aktívne peptidy majú schopnosť ovplyvniť transkripciu, transláciu aj správne zloženie bielkoviny do jej funkčnej formy za účasti chaperonov. Napríklad Bac7 1-35 cieľi na ribozómy za účelom inhibovať transláciu proteínov. [15] Do tejto skupiny niektoré zdroje radia aj PR-39 [19], ktorý už bol v tejto práci zaradený medzi AMP využívajúce receptor. Je to tak z toho dôvodu, že síce inhibuje syntézu proteínov, no využíva na to membránový receptor, ktorý je jeho primárnym cieľom. [18] Ďalším príkladom zo skupiny peptidov inhibujúcich syntézu proteínov sú peptidy onkocínového alebo apidecínového typu. [19]

Ďalšou skupinou sú peptidy inhibujúce proteázovú aktivitu. Veľké množstvo peptidov môže ovplyvniť mnohé metabolické aktivity práve inhibíciou proteázovej aktivity. Príkladom peptidu s touto vlastnosťou je histatín 5. Má silný inhibičný efekt na proteázy vylúčené hosťiteľom aj baktériou. Ďalšími zástupcami sú indolicidín a eNAP-2. Sú schopné inhibovať funkciu mikrobiotickej serínovej proteázy, chymotrypsínu a elastázy. Do tejto skupiny peptidov radíme aj katelicidín-BF. Je to antimikrobiálne aktívny peptid izolovaný z jedu hada *Bungarus fasciatus*. Má mimoriadnu efektívnu v inhibícii trombínom vyvolanej agregácie krvných doštičiek. Ďalej blokuje proteázou aktivovaný receptor 4. [15]

Tretou skupinou sú antimikrobiálne aktívne peptidy zasahujúce nukleové kyseliny. AMP sa môžu priamo naviazať na nukleovú kyselinu, čím spôsobia jej zničenie, ale zároveň môžu aj nepriamo inhibovať replikáciu alebo transkripciu DNA. Indolicidíny sú peptidy, ktoré už boli spomenuté v spojitosti s inhibíciou proteázovej aktivity. Ich ďalšou vlastnosťou je inhibícia syntézy DNA. [19] Špecificky zasahuje abázický koniec DNA, a zároveň môže inhibovať aj DNA topoizomerázu I. [15] Do tejto skupiny sa radí aj buforín II. Nedávne štúdie ukázali, že má schopnosť naviazať sa na DNA aj RNA. [19]

Ďalšou kategóriou sú antimikrobiálne aktívne peptidy inhibujúce delenie bunky. Majú niekoľko mechanizmov, ktorými to dosiahnu. Môžu zablockovať replikáciu alebo odpoveď na poškodenie DNA, ďalej môžu narušiť bunecný cyklus alebo zabezpečiť zlyhanie replikácie chromozómov. Tento mechanizmus je častý predovšetkým u antimykoticky aktívnych peptidov. Napríklad peptid APP môže efektívne zabiť *Candida albicans* vďaka svojim vlastnostiam jednoduchej penetrácie bunky, silnej väzbe na DNA a v neposlednom rade vďaka schopnosti zastaviť S-fázu v intracelulárnom prostredí. [15]

Okrem týchto štyroch kategórií poznáme ešte antimikrobiálne aktívne peptidy ovplyvňujúce aktivitu enzýmov. Patrí tam NP-6, čo je peptid izolovaný zo semien korenia, ktorý prudko inhibuje beta-galaktozidázovú aktivitu *E. coli*. [19]

Ďalej to môžu byť peptidy ovplyvňujúce syntézu bunecnej steny. Príkladom je teixobaktín, ktorý sa viaže na lipid II a lipid III, čo sú prekursory teichoovej kyseliny v bunecnej stene. Väzby peptidov na lipid II už boli spomínané v spojitosti s inými zástupcami v kapitole „AMP využívajúce receptor“. [19]

3.4.2 AMP schopné imunomodulácie

Ďalšou schopnosťou antimikrobiálne aktívnych peptidov je získavanie a aktivácia imunitných buniek, čo vedie k zintenzívneniu zabíjania mikrobov alebo kontrole zápalu. [16] AMP sú radené medzi súčasť vrodenej imunity, podieľajú sa na prvej odpovedi organizmu na inváziu patogénov. Majú rôzne schopnosti. Niektoré peptidy indukujú aktiváciu a diferenciáciu bielych krviniek, iné redukujú expresiu zápalových chemokínov. [18] Ďalej podporujú chemotaktickú aktivitu, stimulujú angiogézu a modulujú expresiu zápalových cytokínov. Vďaka týmto moduláciám imunitnej odozvy organizmu sa potenciál farmaceutického využitia antimikrobiálne aktívnych peptidov ešte násobí. [10]

Adekvátna protizápalová odpoveď napomáha eliminácií patogénu a infikovaných buniek, no nadmerný dlhotrvajúci zápal môže viesť k poškodeniu tkaniva a iným komplikáciám. Preto by zápalová aktivita mala byť kontrolovaná, aby zostala zachovaná homeostáza prostredia. Na základe miery expresie antimikrobiálne aktívnych peptidov, môžu peptidy zápal aj podporiť, aj tíšit. [19]

Podávanie ľudských peptidov *in vivo* modeloch infekcií vykazuje viaceré protektívne účinky. Niektoré AMPs môžu pôsobiť ako regulačné molekuly. Napríklad defenzíny môžu prilákať fagocyty a lymfocyty do miesta infekcie, podporiť proliferáciu fibroblastov alebo modifikovať tok iónov v epitelových bunkách. Antimikrobiálne aktívne peptidy môžu ďalej zabrániť šíreniu infekcie a indukovať mitózu fibroblastov a epitelových buniek. Na základe schopnosti peptidov stimulovať aktiváciu komplemetu a produkciu cytokínov, sa ďalej skúma ich vplyv na humorálnu imunitu. [14]

Vrodené obranné regulátory (IDR) sú syntetické variácie odvodené od prírodných antimikrobiálne aktívnych peptidov. Zástupca tejto skupiny, IDR-1018, sa ukazuje ako sľubný prostriedok na redukciu zápalovej odpovede pri malárii, aj keď nemá priamu antimalarickú aktivitu. Kombinácia niektorých antimalarík a IDR-1018 sa používala

v pokusoch na myšiach. Výsledkom bolo, že kombinácia týchto látok zredukovala nervový zápal, ktorý je smrteľný. Napriek tomu, že AMP sa v prvom rade považujú za súčasť vrodenej imunity, na základe tohto príkladu vidno, že sa vedia podieľať na práci adaptívnej imunity. [16]

V organizme rozoznávame dva druhy peptidov. Môžu to byť buď základné peptidy, ktoré sú produkované s istou frekvenciou, alebo sú to peptidy, ktorých produkcia je spustená zápalom. Neutrofilové a makrofágové sa vyznačujú tvorbou základných peptidov. Bunky epitelu produkujú AMP až po stimulácii povrchu sliznice. [18] V nasledujúcej časti bude priblížená aktivita niektorých konkrétnych peptidov.

3.4.2.1 LL-37

Tento peptid bol už spomenutý v kapitole „Modely“, konkrétne pri kobercovom modeli. No ako už bolo spomenuté v kapitole 1.4, AMPs fungujú v „multi-hit“ móde, majú teda viacero mechanizmov, ktorými môžu operovať.

LL-37 je peptid, ktorý môžu tvoriť neutrofilové, mastocyty, NK bunky a bunky epitelu. [19] LL-37 má značný účinok na kontrolu prozápalových mediátorov indukovaných LPS. [11] Ďalej významne podporuje migráciu monocytov a makrofágov a fagocytózu gram-pozitívnych a gram-negatívnych baktérií. [19]

LL-37 môže mať prozápalovú aj protizápalovú aktivitu. V niektorých prípadoch môžu do veľkej miery redukovať uvoľnenie prozápalových cytokínov v LPS-stimulovaných neutrofiloch, no v iných prípadoch ho môžu naopak stimulovať. [19]

3.4.2.2 Defenzíny

Defenzíny sa vyznačujú silnou pro-zápalovou funkciou. Rozoznávame alfa-defenzíny a beta-defenzíny. [19] Pôvodcami alfa-defenzínov 1-4 sú najčastejšie neutrofilové. Spolu s lyzozómami, proteázami a inými proteínmi sa podieľajú na zničení patogénu. Ľudské alfa-defenzíny 5-6 sú vo veľkej miere vylučované Panethovými bunkami lokalizovanými na dne Lieberkühnových krýpt v tenkom čreve alebo epitelovými bunkami genitálií. [14]

Beta-defenzíny (HBD) sa prirodzene objavujú na koži a sliznici cicavcov. Pripisuje sa im rola v prepájaní vrodenej a získanej imunity. Pôsobia antimikrobiálne a majú preukázateľnú imunomodulačnú funkciu. [14]

Svoju imunomodulačnú funkciu plnia reguláciou veľkého množstva imunitných buniek. Majú vplyv na mastocyty, monocyty a makrofágy či pamäťové T bunky. Zistilo sa, že HBD 2-4 by mohli stimulovať expresiu IL-6, IL-10, MCP-1 a iných dôležitých pôsobkov. Zároveň HBD 2-3 podporujú mononukleárne a polymorfonukleárne bunky v produkcii TNF-alfa, IL-10 a IL-6 v zápalovom prostredí. Tieto pôsobky navyše podporujú expresiu ďalších antimikrobiálne aktívnych peptidov, čím sa celý proces takpovediac cyklí. Vzhľadom na to, že sú beta-defenzíny vo veľkom prítomné na povrchoch slizníc, považujú sa za významný faktor homeostázy a celkového zdravia. [14]

3.5 Environmentálne faktory ovplyvňujúce aktivitu antimikrobiálne aktívnych peptidov

3.5.1 Kovové ióny

Aktivitu antimikrobiálne aktívnych peptidov môžu ovplyvniť napríklad sodné alebo horečnaté katióny. Je dôležité podotknúť, že jednotlivé ióny ovplyvňujú peptidy rôznou mierou na základe svojej valencie. Napríklad dvojmocné katióny sú silnejšími stimulantmi eliminácie baktérií než monovalentné katióny v kombinácii s tanatínom a s-tanatínom, čo sú hmyzie AMP. Ďalším príkladom je prítomnosť chloridu sodného v rôznych experimentoch s antimikrobiálne aktívnymi peptidmi. V prítomnosti NaCl sú signálne odpovede počas asociačných fáz dramaticky znížené v rôznych kinetických experimentoch. Vedie to k zníženej miere asociácie. Tento jav môže byť spôsobený tieniacim efektom NaCl medzi pozitívne nabitým peptidom a membránou s zwitteriónovým charakterom. Ďalším možným dôvodom je potenciálne naviazanie sodného katiónu na fosfolipidovú dvojvrstvu, kde ióny interagujú s fosfátom a karbonylovým kyslíkom lipidových skupín. Okrem toho, redukovaná aktivita syntetického peptidu v slanom prostredí môže byť podmienený narušením alfa-helixovej štruktúry. Svoj význam má aj koordinácia meďnatých a nikelnatých iónov. Môže indukovať baktericídnu aktivitu. [9, 15]

V spojitosti s aktivitou antimikrobiálne aktívnych peptidov hrajú významnú rolu aj ióny železa. Tie sú hojne zastúpené v ľudských slinách. Majú schopnosť výraznou mierou znížiť napríklad antimykotickú aktivitu histatínu 5 rozrušením jeho alfa-helixovej štruktúry. Ióny železa tiež napomáhajú k zhlukovaniu peptidov. Rozpoznávajú totiž špecifické aminokyseliny. Rovnako môžu napomôcť formovaniu soľných mostov medzi molekulami peptidov. [15, 28]

Niektoré AMP sú negatívne nabité, obsahujú zvyšky glutamovej kyseliny a asparágovej kyseliny. Vyžadujú zinok ako funkčný kofaktor, pretože zinočnatý komplex, v tomto prípade, navyšuje antibakteriálnu aktivitu. Ďalšou funkciou zinočnatých iónov je schopnosť stabilizovať agregáciu peptidov na bunecnej membráne, to zlepšuje antibakteriálny efekt DCD-1L. [39]

3.5.2 pH

Mnoho antimikrobiálne aktívnych peptidov vykazuje antimikrobiálnu aktivitu v pomerne širokom rozmedzí pH. Niektoré AMP majú zvýšenú aktivitu za pôsobenia nízkeho pH, pretože majú bázické vlastnosti. Tie sú späté s chovaním histidínu v kyslom pH. Jeho protonácia podporuje elektrostatické interakcie s aniónovými povrchmi, a tak napomáha antibakteriálnej aktivite. Treba dodať, že toto je iba jeden príklad, vplyv pH na antimikrobiálne peptidy sa líši peptid od peptidu. Príkladom peptidu, ktorý nepreferuje kyslé podmienky, je tanatín. Jeho aktivita v boli proti mikróboom je vyššia v neutrálnom pH. [13, 15]

Citlivosť niektorých peptidov na pH je často využívaná na docielenie určitého terapeutického efektu. Ďalšou skutočnosťou je, že interakcia nábojov je jedným z najvýznamnejších faktorov zhlukovania peptidov. Preto je upravovanie pH najpoužívanejším mechanizmom na kontrolu vzájomného zhlukovania a vzdďalovania peptidov. [13, 15]

3.5.3 Proteázy

Proteázy majú silný ničivý efekt na antimikrobiálne aktívne peptidy. LL-37 vykazuje najsilnejší inhibičný efekt na chlamýdie, no jeho účinok je inhibovaný proteázou, ktorú vylučuje *Chlamydia*. Z toho dôvodu sa štúdie sústreďujú na navrhnutie peptidových nosičov, ktoré by tento problém vyriešili. [12, 15]

Na proteázovú aktivitu je náchylný aj KR-12. Prítomnosť pevnej chitozanovo-silicovej podpory chráni tento peptid pred hydrolýzu alfa-trypsínom. Miera ochrany je zvýšená o 38% v porovnaní so stavom bez nosiču. Na druhej strane existuje aj niekoľko proteáz, ktoré podporujú vzájomné zhlukovanie peptidov. To podporuje aktivitu AMP. Príkladmi takýchto proteáz sú: proteáza 65, esteráza 66 alebo fosfatáza 67. [15]

3.6 Expresia a regulácia AMP

Antimikrobiálne aktívne peptidy sa prirodzene vyskytujú na takmer všetkých častiach tela vystavených mikróbov ako je napríklad koža, črevná sliznica, ústna sliznica, pľúca, oči a reprodukčný systém. Ako bolo už spomínané v kapitole 1.4.2, ktorá sa venovala peptidom schopným imunomodulácie, rozoznávame peptidy produkované s istou pravidelnosťou a peptidy, ktorých tvorba je vyprovokovaná zápalom, tie tvoria väčšiu množinu. Špecifické miesta expresie a striktná regulácia môžu byť kľúčom k úplnému pochopeniu účinku antimikrobiálne aktívnych peptidov. [10]

AMP sú v prírode produkované pomocou ribozomálnej translácie mRNA alebo neribozomálnou syntézou. Neribozomálne syntetizované peptidy sú produkované predovšetkým baktériami, zatiaľ čo ribozomálne syntetizované peptidy sú typické pre eukaryotov. Mnohé gény antimikrobiálnych peptidov zdieľajú jeden chromozomálny lokus a môžu byť spolu aj exprimované. Tento jav je bežný u alfa-defenzínov a beta-defenzínov. Táto skupina peptidov je exprimovaná vo forme neaktívnych prekurzorov, ktoré nazývame prepropeptidy. Obsahujú signálny peptid a pro-doménu, jej hlavná funkcia spočíva v udržiavaní zrelého peptidu v neaktívnom stave. Medzi ďalšie schopnosti patrí aj správne zloženie C-konca. Po vypudení do extracelulárneho priestoru sa uvoľní zrelý peptid. Pro-doména sa väčšinou nachádza na N-konci reťazca, výnimkou sú rastliny a niektoré druhy rýb. Variabilita zrelého peptidu je podmienená adaptáciou na výzvy spôsobené patogénmi. Väčšina AMP podstupuje post-translačné modifikácie dôležité pre ich správnu funkciu a štruktúru. V súčasnosti poznáme 15 druhov týchto modifikácií. Príkladmi sú glykosylácia, tvorba disulfidických mostíkov, hydroxylácia, fosforylácia a iné. [17]

3.6.1 Expresia AMP na koži

Keratinocyty, ako bunky prevládajúce v pokožke, sú sústavne vystavované mikroorganizmom z vonkajšieho prostredia. To z nich robí prvú líniu obrany pred inváziou patogénov. Tieto bunky môžu byť vyprovokované k produkcii rôznych peptidov. Keratinocyty produkujú viaceré peptidy z rodiny beta-defenzínov. Beta-defenzín 1 je produkovaný bez ohľadu na prítomné podnety, no tvorba beta-defenzínov 2 a 3 je vyvolaná počas liečby rán alebo infekcií. Ďalšou významnou rodinou peptidov sú katelicidíny. Tie sú produkované nielen keratinocytmi, ale aj bunkami s pôvodom v kostnej dreni, ktoré môžeme nájsť aj na koži. Sú to neutrofily, mastocyty alebo dendritické bunky. Nové poznatky ukázali, že dokonca aj adipocyty sú významným zdrojom katelicidínov, a to počas

napadnutia *Staphylococcus aureus*. AMP sú tvorené aj komenzálnymi baktériami prítomnými na pokožke, potnými žľazami a mazovými žľazami. [10]

3.6.2 Expresia AMP v črevách

Ľudské črevá interagujú s veľkým množstvom komenzálnych baktérií, ale aj s mnohými patogénmi. Črevné antimikrobiálne aktívne peptidy majú schopnosť odraziť požitý patogén, no zároveň zastávajú významnú úlohu v udržiavaní zdravej rovnováhy medzi hosťom a extrémnym množstvom komenzálnych baktérií. Panethove bunky sú najväčším zdrojom AMP v tenkom čreve. Produkujú alfa-defenzíny HD-5 a HD-6, lektíny, fosfolipázu 2 a angiogénin 4. HD-5 a HD-6 a sú exprimované so stálou frekvenciou. [10]

Podobne ako stavovce, aj hmyz secerňuje tkanivovo-špecifické AMP na sliznici vnútorností. Tie sú významným faktorom odolnosti hmyzu voči intestinálnym parazitom. [10]

3.7 Design AMP

Antimikrobiálne aktívne peptidy získané priamo z prírodných zdrojov často nemajú vhodnú štruktúru na použitie v terapii. [36] Napriek tomu platí, že AMP majú celkovo dobré aplikačné predpoklady. S ich aktivitou je však spojených niekoľko problémov. [15] Mnohé AMP, ktoré cieľia na membránu takto pôsobia s vysokou efektivitou a môžu významne narúšať biologické membrány. Táto vlastnosť je pri zneškodňovaní patogénov veľmi výhodná, no pri vyššej koncentrácii peptidov môže vyústiť až do poškodzovania hosťovských buniek, čo sa spája s hemolytickými vedľajšími účinkami. Ďalšou komplikáciou je aj náchylnosť na pôsobenie enzýmov [11], stabilita iba pri určitom pH, citlivosť na prítomnosť železa a určitých druhov séra alebo vysoká výrobná cena a technické problémy. Z týchto komplikácií vyplývajú aj ideálne vlastnosti antimikrobiálne aktívnych peptidov: vysoká antimikrobiálna aktivita, nízka toxicita voči hosťovským bunkám, vysoká stabilita, nízka sérová väzobná kapacita a jednoduchá a lacná produkcia. Na tieto aspekty berie zreteľ vedecká obec, ktorá venuje v poslednej dobe pomerne veľa pozornosti práci s antimikrobiálne aktívnymi peptidmi. Pri ich navrhovaní je kľúčové navrhnuť správnu dĺžku reťazca, sekundárnu štruktúru, náboj, lipofilný-hydrofilný charakter. Existuje niekoľko spôsobov navrhovania a vylepšovania antimikrobiálne aktívnych peptidov. Je to napríklad používanie rekombinantných techník, tvorba podľa rôznych motívov alebo templátov, počítačový dizajn, návrh založený na „self-assembling“ peptidov, používanie vhodných prenosných systémov, ale aj chemická modifikácia alebo použitie nanotechnológie. [15]

Posledné dva spôsoby budú teraz priblížené detailnejšie. Oba vykazujú veľký potenciál v použití v klinickej praxi, no zároveň oba fungujú na veľmi odlišnom princípe.

3.7.1 Použitie nanotechnológie v dizajne AMP

Nanotechnológie sú technológiou, ktorá môže do veľkej miery potlačiť nežiadúce vlastnosti antimikrobiálne aktívnych peptidov, a zároveň môžu podporiť ich efektivitu. Hlavnú úlohu v tejto technike hrajú takzvané „nanocarriers“, čo sú nosiče vhodné na odoslanie liečiva. Umožňujú kontrolované uvoľnenie liečiva vďaka plánovanej degradácii nosiča. Výhodou je, že metabolická a chemická stabilita peptidu je pomerne dobre zachovaná, podmieňuje to biokompatibilita a jednoduchá biodegradácia používaných materiálov. Najčastejšie sú to lipidy alebo polyméry. Konkrétnym príkladom je nano-gél na báze kyseliny hyalurónovej, ktorý sa používa pri aplikácii LLKKK18, čo je analóg peptidu LL-37. Jeho aktivita je cieleňá predovšetkým voči mykobaktériám, spomínaný typ nosiča vylepšuje tieto vlastnosti *in vivo* aj *in vitro*. Novým trendom je používanie zlatých nanočastíc. Ich použitie je výhodné, pretože vykazujú nízku toxicitu a nie sú imunogénne. [36]

Nanotechnológie nie sú novinkou ani vo vylepšovaní antibiotík. Vylepšujú ich rozpustnosť, stabilitu, biologickú dostupnosť, pomáhajú udržať stálu aktivitu, a zároveň sú schopné zredukovať vedľajšie účinky antibiotika a znížiť potrebnú dávku. [11]

Použitie vhodných nanonosičov na „zabalenie“ AMP sa nazýva nanokapsulácia. Tento dej má veľký potenciál, pretože poskytuje malú veľkosť častice, veľký povrch, vysokú cieľiacu aktivitu, špecificitu, stabilitu, nízku toxicitu a vysokú efektivitu. Nanokapsulácia zároveň môže zabrániť problémom ako je proteolytická degradácia a nežiaduce membránové interakcie. [11]

Nanokapsulácia môže fungovať buď pasívne, alebo aktívne. Pri pasívnej forme procesu sa nezmenia povrchové štruktúry počas obalovania. Naopak pri aktívnej kapsulácii sa pridáva ligand s vysokou afinitou a špecificitou cieleňia. Ten vedie peptid na žiadané miesto, čo je zvyčajne povrch patogénu. [11]

Použitie nanočastíc v kombinácii s AMP bolo doposiaľ skúmané iba na laboratórnych zvieratách, no očakáva sa, že by sa táto technika mohla zapracovať aj do klinickej praxe. Ich použitie však má jednu veľkú komplikáciu, ktorá ešte iba čaká na svoje riešenie. Peptidy majú tendenciu interagovať so stenou nanonosičov, čo vedie k nedostatočnému uvoľňovaniu liečiva a nepostačujúcej biologickej dostupnosti. [36]

3.7.2 Chemické modifikácie

Na vylepšenie stability peptidov využívame veľké množstvo chemických modifikácií. Jedným z hlavných cieľov je ochrana proti proteolytickému natráveniu. Dá sa to dosiahnuť napríklad zabudovaním D-aminokyseliny (neprirodného pôvodu) do sekvencie antimikrobiálne aktívneho peptidu. Enzým je stereošpecifický, a tak zabudovanie neprirodnej aminokyseliny predíde degradácií zmenou stereochemických vlastností peptidu. Je však nutné dodať, že syntéza peptidov s D-aminokyselinami je finančne veľmi nákladná. [16]

Často využívanou metódou je aj halogenácia. Tá do veľkej miery ovplyvňuje aktivitu, špecificitu a stabilitu antimikrobiálne aktívnych peptidov. Peptid jeleín-I sa získava z materskej kašičky včely *Apis mellifera*. Nahradením fenylalanínu halogenovaným analógom fenylalanínu sa markantne zvýši antibakteriálna aktivita *in vitro* a zároveň sa zvýši proteolytická stabilita. Halogenácia je úzko prepojená aj so špecificitou účinku antimikrobiálne aktívnych peptidov. Pridaním zvyšku s halogénom môže byť podporená aktivita voči istým druhom patogénov, no zároveň môže byť znížená aktivita voči iným druhom. [15]

Cyklizácia prebieha u prírodne objavujúcich sa antimikrobiálne aktívnych peptidov tromi spôsobmi: disulfidickými mostíkmi, vnútorným spájaním bočných reťazcov a „head-to-tail“ cyklením. Syntéza disulfidických mostíkov veľmi často komplikuje vývoj syntetických peptidov. Príkladom peptidu, ktorého účinky boli vylepšené cyklizáciou, je arenicín-1. Cyklizácia jeho hlavného reťazca spôsobila zvýšenie aktivity vo vzťahu k niektorým rezistentným patogénom, a zároveň nenavýšila jeho toxicitu voči hostiteľovi. [15]

Ďalšou stratégiou je tvorba „peptidomimetika“, čo je polymér alebo oligomér pripomínajúci peptid. Hlavným cieľom pri jeho tvorbe je zachovanie 2D a 3D priestorovej štruktúry postranných reťazcov, no zároveň musí dôjsť k pozmeneniu základného reťazca. Tým by sme mali zachovať aktivitu a zabrániť proteolýze. Do tejto skupiny radíme aj peptoidy, čo sú izoméry peptidov, v ktorých sú bočné reťazce pripojené k dusíku základného reťazca namiesto α -uhlíku. Táto zmena ich robí rezistentným voči proteázovej degradácii. [16]

„Capping“ je pridanie špecifickej modifikácie na C-koniec alebo N-koniec peptidu. Touto technikou sa docielí nadobudnutie vlastností charakteristických pre prírodné peptidy aj u syntetických peptidov. Posttranslačné modifikácie peptidov hrajú významnú úlohu v zachovávaní funkcií AMP a sú bežne používané pri ich dizajne. Modifikácie koncov

aromatickými aminokyselinami je hlavný spôsob hydrofóbneho označovania koncov. Pre tieto účely sa bežne používa tryptofán a fenylalanín. [15]

Posledným z najbežnejších spôsobov chemickej modifikácie peptidov je konjugácia s bočnými reťazcami alebo fragmentmi peptidov. Docielenie konjugácie peptidov je cieľom veľkej časti vedeckej obce. Zvládnutie tohto kroku pomôže vytvoriť aktívne a stabilné antimikrobiálne aktívne peptidy s vysokou selektivitou. Táto technika môže zlepšiť selektivitu účinku a stabilitu v rôznych podmienkach, ako je napríklad iné pH alebo slanosť prostredia. [15]

4. Záver

Antibiotická rezistencia je vážny problém súčasného zdravotníctva. Dáta ukazujú, že má stupňujúcu sa tendenciu. Preto bude stále ťažšie nájsť účinné antibiotiká. Antimikrobiálne aktívne peptidy by mohli byť vhodnou náhradou za antibiotiká. Okrem toho, že sa vyznačujú priamo antimikrobiálnou aktivitou, majú aj schopnosť regulovať zápalové reakcie, privolávať bunky a stimulovať ich proliferáciu, napomáhať hojeniu rán, modifikovať génovú expresiu a regulovať imunitné pochody počas respiračných či zápalových infekcií.

Treba však dodať, že na to, aby sa mohli začať bežne používať je stále treba vyriešiť množstvo komplikácií s nimi spojenými. Komplikáciou v uvedení AMP do bežnej klinickej praxe je ich vysoká výrobná cena. Problém je aj s nedostatkom toxikologických štúdií, ktoré by potvrdili bezpečnosť peptidov. Veľkou výzvou je aj zabránenie ich prípadnej hemolytickej aktivity. Prírodné peptidy sa vyznačujú pomerne nízkou stabilitou a krátkym polčasom.

Faktom zostáva, že aj keď máme veľa výziev spojených s vývinom ideálnych antimikrobiálne aktívnych peptidov, vykazujú veľmi dobré vlastnosti a ich ďalší vývoj by mohol ponúknuť významný pokrok na poli medicíny, ale aj akvakultúry či poľnohospodárstva. [34]

Zdroje použitéj literatúry

- [1] G. Kapoor, S. Saigal, and A. Elongavan, “Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians,” *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, vol. 33, no. 3, p. 300, 2017, doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- [2] J.-H. Jo *et al.*, “Alterations of human skin microbiome and expansion of antimicrobial resistance after systemic antibiotics,” *Sci Transl Med*, vol. 13, no. 625, Dec. 2021, doi: 10.1126/scitranslmed.abd8077.
- [3] World Health Organization, “Antibiotic resistance.” Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- [4] T. M. Uddin *et al.*, “Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects,” *J Infect Public Health*, vol. 14, no. 12, pp. 1750–1766, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.jiph.2021.10.020.
- [5] G. Karam, J. Chastre, M. H. Wilcox, and J.-L. Vincent, “Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance,” *Crit Care*, vol. 20, no. 1, p. 136, Dec. 2016, doi: 10.1186/s13054-016-1320-7.
- [6] R. J. Fair and Y. Tor, “Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century,” *Perspect Medicin Chem*, vol. 6, p. PMC.S14459, Jan. 2014, doi: 10.4137/PMC.S14459.
- [7] D. F. Pancu *et al.*, “Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with Antibacterial Activity—A Pharmacotoxicological Screening,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 4, p. 401, Apr. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10040401.
- [8] M. I. Hutchings, A. W. Truman, and B. Wilkinson, “Antibiotics: past, present and future,” *Curr Opin Microbiol*, vol. 51, pp. 72–80, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- [9] C. M. Agbale *et al.*, “Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Helical Antimicrobial Peptide Sequences Incorporating Metal-Binding Motifs,” *Biochemistry*, vol. 58, no. 36, pp. 3802–3812, Sep. 2019, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00440.
- [10] L. Zhang and R. L. Gallo, “Antimicrobial peptides,” *Curr Biol*, vol. 26, no. 1, pp. R14–R19, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017.

- [11] S. Gera, E. Kankuri, and K. Kogermann, “Antimicrobial peptides – Unleashing their therapeutic potential using nanotechnology,” *Pharmacol Ther*, vol. 232, p. 107990, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107990.
- [12] T. Sarkar, M. Chetia, and S. Chatterjee, “Antimicrobial Peptides and Proteins: From Nature’s Reservoir to the Laboratory and Beyond,” *Front Chem*, vol. 9, Jun. 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.691532.
- [13] J. Xuan *et al.*, “Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections,” *Drug Resist. Updat*, vol. 68, p. 100954, May 2023, doi: 10.1016/j.drug.2023.100954.
- [14] J. Talapko *et al.*, “Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications,” *Antibiotics*, vol. 11, no. 10, p. 1417, Oct. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11101417.
- [15] Y. Huan, Q. Kong, H. Mou, and H. Yi, “Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields,” *Front Microbiol*, vol. 11, Oct. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.582779.
- [16] P. Kumar, J. Kizhakkedathu, and S. Straus, “Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo,” *Biomolecules*, vol. 8, no. 1, p. 4, Jan. 2018, doi: 10.3390/biom8010004.
- [17] D. M. Mabrouk, “Antimicrobial peptides: features, applications and the potential use against covid-19,” *Mol Biol Rep*, vol. 49, no. 10, pp. 10039–10050, Oct. 2022, doi: 10.1007/s11033-022-07572-1.
- [18] T. Singh, P. Choudhary, and S. Singh, “Antimicrobial Peptides: Mechanism of Action,” in *Insights on Antimicrobial Peptides*, IntechOpen, 2022. doi: 10.5772/intechopen.99190.
- [19] Q. Y. Zhang *et al.*, “Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential,” *Mil Med Res*, vol. 8, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2021. doi: 10.1186/s40779-021-00343-2.
- [20] L. C. P. Vilas Boas, M. L. Campos, R. L. A. Berlanda, N. de Carvalho Neves, and O. L. Franco, “Antiviral peptides as promising therapeutic drugs,” *Cell Mol Life Sci*, vol. 76, no. 18, pp. 3525–3542, Sep. 2019, doi: 10.1007/s00018-019-03138-w.

- [21] P. N. Dlozi, A. Gladchuk, R. D. Crutchley, N. Keuler, R. Coetzee, and A. Dube, “Cathelicidins and defensins antimicrobial host defense peptides in the treatment of TB and HIV: Pharmacogenomic and nanomedicine approaches towards improved therapeutic outcomes,” *Biomed Pharmacother*, vol. 151, p. 113189, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113189.
- [22] C. A. Demeke, G. M. Adinew, T. B. Abebe, A. T. Gelaye, S. G. Gemedo, and D. K. Yimenu, “Comparative analysis of the effectiveness of narrow-spectrum versus broad-spectrum antibiotics for the treatment of childhood pneumonia,” *SAGE Open Med*, vol. 9, p. 205031212110443, Jan. 2021, doi: 10.1177/20503121211044379.
- [23] Hogg Stuart, *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons Ltd, 2005.
- [24] World Health Organization, “HIV and AIDS.” Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
- [25] G. Jin and A. Weinberg, “Human antimicrobial peptides and cancer,” *Semin Cell Dev Biol*, vol. 88, pp. 156–162, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.semcdb.2018.04.006.
- [26] D. V. Patangia, C. Anthony Ryan, E. Dempsey, R. Paul Ross, and C. Stanton, “Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health,” *Microbiologyopen*, vol. 11, no. 1, Feb. 2022, doi: 10.1002/mbo3.1260.
- [27] World Health Organization, “Leishmaniasis.” Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- [28] J. I. Lachowicz *et al.*, “Metal self-assembly mimosine peptides with enhanced antimicrobial activity: towards a new generation of multitasking chelating agents,” *Dalton Trans*, vol. 49, no. 9, pp. 2862–2879, 2020, doi: 10.1039/C9DT04545G.
- [29] S. Mc Carlie, C. E. Boucher, and R. R. Bragg, “basis of bacterial disinfectant resistance,” *Drug Resist Updat*, vol. 48, p. 100672, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.drug.2019.100672.
- [30] M. Venkatesan *et al.*, “Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics,” *Nat Commun*, vol. 14, no. 1, p. 4031, Jul. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-39778-7.
- [31] World Health Organization, “Neglected tropical diseases.” Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1

- [32] Jimenez Darcy, “New BIO report forecasts an uncertain future for the antibiotics sector.” Dostupné z: <https://www.pharmaceutical-technology.com/news/new-bio-report-forecasts-uncertain-future-antibiotics-sector/?cf-view&cf-closed>
- [33] T. Avis, F. X. Wilson, N. Khan, C. S. Mason, and D. J. Powell, “Targeted microbiome-sparing antibiotics,” *Drug Discov Today*, vol. 26, no. 9, pp. 2198–2203, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.drudis.2021.07.016.
- [34] J. Lei *et al.*, “The antimicrobial peptides and their potential clinical applications.,” *Am J Transl Res*, vol. 11, no. 7, pp. 3919–3931, 2019.
- [35] J. J. Leisner, “The Diverse Search for Synthetic, Semisynthetic and Natural Product Antibiotics From the 1940s and Up to 1960 Exemplified by a Small Pharmaceutical Player,” *Front Microbiol*, vol. 11, Jun. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00976.
- [36] A. Parchebafi, F. Tamanaee, H. Ehteram, E. Ahmad, H. Nikzad, and H. Haddad Kashani, “The dual interaction of antimicrobial peptides on bacteria and cancer cells; mechanism of action and therapeutic strategies of nanostructures,” *Microb Cell Fact*, vol. 21, no. 1, p. 118, Jun. 2022, doi: 10.1186/s12934-022-01848-8.
- [37] R. E. W. Hancock, E. F. Haney, and E. E. Gill, “The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity,” *Nat Rev Immunol*, vol. 16, no. 5, pp. 321–334, May 2016, doi: 10.1038/nri.2016.29.
- [38] D. M. Livermore, “The need for new antibiotics,” *Clin Microbiol Infect*, vol. 10, pp. 1–9, 2004, doi: 10.1111/j.1465-0691.2004.1004.x.
- [39] C. Donaghy, J. G. Javellana, Y.-J. Hong, K. Djoko, and A. M. Angeles-Boza, “The Synergy between Zinc and Antimicrobial Peptides: An Insight into Unique Bioinorganic Interactions,” *Molecules*, vol. 28, no. 5, p. 2156, Feb. 2023, doi: 10.3390/molecules28052156.
- [40] M. Magana *et al.*, “The value of antimicrobial peptides in the age of resistance,” *The Lancet Infect Dis*, vol. 20, no. 9. Lancet Publishing Group, pp. e216–e230, Sep. 01, 2020. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30327-3.
- [41] D. C. Hooper and G. A. Jacoby, “Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 6, no. 9, p. a025320, Sep. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a025320.

- [42] F. Spagnolo, M. Trujillo, and J. J. Dennehy, "Why Do Antibiotics Exist?," *mBio*, vol. 12, no. 6, Dec. 2021, doi: 10.1128/mBio.01966-21.
- [43] L. M. Lima, B. N. M. da Silva, G. Barbosa, and E. J. Barreiro, "β-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective," *Eur J Med Chem*, vol. 208, p. 112829, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829.

Zdroje použitých obrázků

- [1] B. Amorim-Carmo, A. M. S. Parente, E. S. Souza, A. A. Silva-Junior, R. M. Araújo, and M. F. Fernandes-Pedrosa, “Antimicrobial Peptide Analogs From Scorpions: Modifications and Structure-Activity,” *Front Mol Biosci*, vol. 9, May 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.887763.