

LARVÁLNA TERAPIA A ANTIMIKROBIÁLNE PEPTIDY

Emanuel PROCHÁZKA^{1#}, Peter TAKÁČ^{1,2}, Juraj MAJTÁN¹

¹ Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika

² Scientica s.r.o., Hybešova 33, 831 06 Bratislava, Slovenská republika

autor pre korešpondenciu; e-mail: emanuel.prochazka@savba.sk

PROCHÁZKA, E., TAKÁČ, P. & MAJTÁN, J. 2013: Larval therapy and antimicrobial peptides. *Entomofauna Carpathica*, 25(2): 57-68.

Abstract: When Alexander Fleming discovered penicillin almost a century ago, it seemed that long-lasting battle against bacteria would be win once for all. However, antibiotics are becoming ineffective these days, mainly due to the emergence and spread of antibiotic resistances (leading to multi-drug resistant strains of bacteria), and the insufficient development of new antibiotics. Among other diseases, multi-resistant strains complicate also treatment of poorly healing chronic wounds. Alternative is provided by larval therapy, most often utilizing larvae of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. Maggots effectively remove dead tissue and pathogenic bacteria from the wound, and promote its healing. Thus, larval therapy may ultimately lead to the development of new generation of antibiotic agents - antimicrobial peptides. These constitute dominant elements of immune defense response against bacterial pathogens in insect. In this respect, biology of *L. sericata* is poorly studied, but antimicrobial properties of maggots make *L. sericata* an attractive model.

Key words: *Lucilia sericata*, larval therapy, antimicrobial peptides, antibiotics

1. ČO JE TO LARVÁLNA TERAPIA?

Bioterapia je Medzinárodnou spoločnosťou pre bioterapie (International Biotherapy Society) definovaná ako použitie živých organizmov v diagnostike a liečení chorôb. Patrí sem napríklad liečba kŕčových žíl pijavicami (hirudoterapia), liečba psoriázy rybkami *Garra rufa* (ichtyoterapia), ale i liečba chronických rán larvami múch (larválna terapia) či terapia včelími produktami (apiterapia) (CHURCH 2013). Larválna terapia je jednou z najznámejších a najstarších bioterapeutických metód, keď už podľa všetkého starovekí Mayovia či domorodí Aboriginovia poznali a využívali blahodarné účinky lariev (WHITAKER et al. 2007). Novodobé dejiny sa spájajú s francúzskymi chirurgmi Ambroisom Pareom a neskôr Dominiqueom Jeanom Larreym, ktorý pozoroval, že larvy múch selektívne konzumujú odumreté tkanivo, kým živé ostáva intaktné (WHITAKER et al. 2007). Ide teda o metódu aplikácie živých lariev, používanú najmä za účelom vyčistenia a dezinfekcie chronických rán, ktoré obsahujú nekrotické tkanivo (ČAMBAL et al. 2013).

Použité skratky: AMP = antimikrobiálny peptid; ES = exkréty / sekréty; MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* rezistentný na metilín); Da (kDa) = Dalton (kiloDalton)

Hojenie rany prechádza štyrmi fázami (zastavenie krvácania, zápal, proliferačná fáza, prestavba rany), pričom každá z nich sa skladá z viacerých čiastkových procesov. Pribeh týchto fáz je dôkladne regulovaný. Narušenie niektorého procesu preto môže viesť k predĺženiu hojenia, respektíve až k vzniku chronickej rany. Dôvodov môže byť viacero, a patrí medzi ne napríklad cukrovka, obezita, ale i vyšší vek. Závažnou komplikáciou je tiež vznik infekcie. Odstraňovanie mikroorganizmov napádajúcich ranu prebieha počas zápalovej fázy, no ak je toto odstraňovanie z rôznych príčin nedostatočné, zápal v rane zotrúva príliš dlho. Dlhá zápalová fáza má na ranu i samotný proces hojenia devastujúce účinky, čo vedie k tomu, že hojenie nedokáže pokračovať a vzniká chronická rana (GUO, DIPIETRO 2010). Navyše, patogénne mikroorganizmy sa v chronických ranách zväčša formujú do tzv. bakteriálneho biofilmu. Biofilm sa podieľa na zabránení efektívnej odpovede imunitného systému a tiež zamedzuje pôsobeniu antibiotík (VAN DER PLAS et al. 2008). Mikroorganizmy, mŕtve tkanivo (slúžiace pre ne ako zdroj živín) a exudáty (výpotky) sa tradične odstraňujú chirurgicky (CHAN et al. 2007; HOFMAN 2007). Alternatívny spôsob vyčistenia (debridementu) spočíva vo využití medicínskych lariev (ČAMBAL et al. 2013), a preto sa tento spôsob nazýva aj biochirurgia (PARNÉS, LAGAN 2007).

Nie všetky druhy mušíc lariev sú však vhodné. Používajú sa larvy niektorých zástupcov čeľade Calliphoridae (*Lucilia cuprina*, *Lucilia illustris*, *Lucilia sericata*, *Phormia regina*, *Protophormia terraenovae*). Najdôležitejšou podmienkou ich využitia je obmedzenie na nekrotické tkanivo. Najčastejšie aplikované a zároveň najviac preštudované sú larvy bzučivky zelenej (*Lucilia sericata*) (DAVYDOV 2011; ZARCHI, JEMEC 2012; ČAMBAL et al. 2013). Z vajčiek tejto muchy sa 12 až 24 hodín po nakladení liahnu larvy veľké 1 až 2 mm, ktoré po 4-5 dňoch v rane dosahujú dĺžku 10 mm (WOLLINA et al. 2000). Počas larválnej fázy je kŕmenie ich dominantnou aktivitou. Potravu pred požitím najprv natrávia enzymatickým koktejlom. Tento obsahuje napríklad leucínovú aminopeptidázu, kolagenázu alebo chymotrypsín podobné proteázy, ktoré ju „skvapalnia“ a premenia na ľahšie stráviteľnejšiu (DAVYDOV 2011).

Larválna terapia sa v súčasnosti používa na vyčistenie rôznych nehojajúcich sa kožných rán a rán mäkkých tkanív, ako napríklad diabetické vredy alebo preležaniny. Využitie nachádza i v liečbe popálenín a problematických pooperačných rán a pri eradikácii odolnej ranovej infekcie, napríklad aktinomykózy a kmeňov *Staphylococcus aureus* rezistentných na meticilín (MRSA) (ČAMBAL et al. 2013; BOWLING et al. 2007). Rýchlosť i úspešnosť liečby jednoznačne vravia v prospech larválnej terapie v porovnaní s konvenčnou liečbou (SHERMAN 2002; SHERMAN 2003). Takisto množstvo exudátov, zápach a bolesť sa vyvíjajú priaznivejšie než počas konvenčnej terapie (COURTENAY et al. 2000). A napokon, larválna alternatíva je výhodnejšia i z ekonomickej stránky (DAVYDOV 2011; ČAMBAL et al. 2013).

Z hľadiska hojenia rany, odstránenie mŕtveho tkaniva nie je jediným blahodárnym účinkom larválnej terapie. Ako už bolo uvedené, larvy dokážu aktívne bojovať proti mikrobiálnym patogénom a redukovať ich biofilm (protektívnu vrstvu). Navyše inhibujú zápalové procesy v rane, indukujú signálne dráhy angiogenézy (tvorby

nových ciev) alebo podporujú migráciu fibroblastov (CAZANDER et al. 2013). Medzi najviac študované patria najmä antimikrobiálne vlastnosti lariev a ich produktov.

2. ANTIMIKROBIÁLNE VLASTNOSTI EXKRÉTOV A SEKRÉTOV LARIEV

Vo svojom prirodzenom prostredí (predstavovanom odumretými telami živočíchov) sú larvy *L. sericata* vystavené mikróbom, s ktorými sa delia o potravu, a ktoré pre ne môžu byť patogénne (KRUGLIKOVA, CHERNYSH 2011). Larvy preto musia mať vyvinuté účinné mechanizmy, ktoré ich pred mikroorganizmami chránia, a ktorými v konečnom dôsledku dezinfikujú ranu. Jeden z takýchto mechanizmov predstavuje eradikácia v tráviacom trakte (MUMCUOGLU et al. 2001). Iný spôsob spočíva vo vylučovaní látok, ktoré ovplyvňujú rast či priamo prežívanie patogénov. Viaceré práce potvrdzujú, že exkréty a sekrety (ES) lariev vykazujú značnú antimikrobiálnu aktivitu, a to ako voči Gram-pozitívnym, tak aj Gram-negatívnym baktériám[†]. Medzi Gram-pozitívne, ktorý rast bol inhibovaný, patrili *S. aureus* a *Bacillus thuringiensis*, kým zástupcami Gram-negatívnych boli *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* a *Pseudomonas aeruginosa* (BEXFIELD et al. 2004). Práve *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, ale aj napríklad druhy rodu *Streptococcus* sú známe ako baktérie osídľujúce ťažko sa hojace rany (PARNÉS, LAGAN 2007). Identifikácia, respektíve molekulárna charakterizácia antimikrobiálnych produktov však zďaleka nie je úplne vyriešená. Viaceré práce popisujú prítomnosť troch skupín látok rozdelených podľa veľkosti, a to <500 Da (alebo <1 kDa), ďalej molekuly o veľkosti do 10 kDa, a napokon molekuly väčšie ako 10 kDa (BEXFIELD et al. 2004; BEXFIELD et al. 2008; KERRIDGE et al. 2005; HUBERMAN et al. 2007a). Frakcia najmenších látok (<500 Da) dokázala účinne inhibovať rast ako štandardných kmeňov *S. aureus*, tak i jeho obávaných príbuzných, meticilín-rezistentných variant (MRSA) (BEXFIELD et al. 2004; BEXFIELD et al. 2008). Hoci jej zloženie ešte nie je známe, vďaka svojmu antibakteriálnemu účinku bola táto frakcia patentovaná a registrovaná ako nové antibiotikum pod názvom Seraticin (CAZANDER et al. 2013). Vo frakcii najmenších molekúl boli doposiaľ identifikované tri zlúčeniny: dve organické kyseliny (obe obsahujúce aromatické benzénové jadro) a cyklický dipeptid obsahujúci dve molekuly aminokyseliny prolínu (HUBERMAN et al. 2007a). Hoci boli extrahované z celých lariev, je pravdepodobné, že sa nachádzajú aj v ich výlučkoch. Najmä ak podľa jednej hypotézy sú produkty obsahujúce aromatické jadro skôr výsledkom metabolizmu symbiotickej baktérie *Proteus mirabilis*, ktorá bola nájdená v tráviacom ústrojenstve lariev (PARNÉS, LAGAN 2007; WHITAKER et al. 2007). Jej potvrdenie si však žiada ďalší výskum.

[†] Baktérie sa dajú na základe zloženia bunkového obalu rozdeliť na Gram-pozitívne a Gram-negatívne. Hlavným rozdielom je prítomnosť ešte jednej membrány u Gram-negatívnych druhov, ktorá zvonku obaluje cytoplazmatickú membránu a bunkovú stenu.

3. ANTIMIKROBIÁLNE PEPTIDY V EXKRÉTOCH A SEKRETOCH

Antibakteriálny účinok mala aj frakcia obsahujúca molekuly do veľkosti 10 kDa (BEXFIELD et al. 2004). Zdá sa, že zodpovedné za aktivitu „v strednom pásme“ sú proteíny, alebo skôr polypeptidy. KRUGLIKOVA a CHERNYSH (2011) separovali hydrofóbne proteíny z ES a analyzovali hmotnostnou spektrometriou. Zámerne sa zamerali na hydrofóbnu frakciu, keďže tu očakávali prítomnosť antimikrobiálnych peptidov (AMP). Dve molekuly mali hmotnosť veľmi blízku dipterícínom nájdeným v hemolymfe príbuznej muchy bzučivky obyčajnej (*Calliphora vicina*). Navyše, podobne ako diptericíny *C. vicina*, i peptidy izolované z ES *L. sericata* vykazovali aktivitu voči Gram-negatívnym baktériám. Identifikovali i signály, ktoré by mohli zodpovedať inej skupine antimikrobiálnych peptidov, a to defenzínov, no tieto neboli bližšie špecifikované (Tab. 1; KRUGLIKOVA, CHERNYSH 2011). Paradoxne, zdá sa, že doteraz najlepšie preskúmaný larválny AMP, lucifenzín (Tab. 1), sa im nepodarilo zachytiť. Lucifenzín je doteraz jediný AMP, ktorého prítomnosť bola potvrdená v ES lariev, a ktorého antimikrobiálne vlastnosti boli preverené. Ide o peptid dlhý 40 aminokyselín (ČEŘOVSKÝ et al. 2010), ktorý patrí do skupiny defenzínov. Odtiaľ v spojení s rodovým názvom bzučivky pochádza jeho názov (*Lucilia defensin*). Defenzíny sú pomerne konzervovaná, no zároveň široko rozšírená skupina látok. Dokonca až tak, že peptidy podobné hmyzím defenzínom boli nájdené aj u škorpiónov či mäkkýšov. Spoločnou vlastnosťou defenzínov je prítomnosť šiestich aminokyselín cysteínov a troch disulfidových väzieb (spájajúcich cysteíny). Aktivita defenzínov spočíva v ich schopnosti interagovať s plazmatickými membránami. Vytvárajú v nich póry, čo vedie k úniku bunkového materiálu a k depolarizácii membrány (BULET et al. 1999). Lucifenzín má, tak ako iné defenzíny, vysokú preferenciu voči Gram-pozitívnym baktériam (ANDERSEN et al. 2010; ČEŘOVSKÝ et al. 2010).

4. IMUNITNÝ SYSTÉM HMYZU A JEHO ODPOVEĎ NA PATOGÉNY

Imunitný systém stavovcov je postavený na dvoch pilieroch, a to na vrodenej imunite, charakterizovanej produkciou antimikrobiálnych látok, a získanej imunite, ktorá je založená na lymfocytoch produkujúcich protilátky. Druhý pilier je takpovediac „obdarovaný“ pamäťou na cudzorodé molekuly. Bezstavovce sa však musia spoľahnúť iba na prvý mechanizmus, ktorého kľúčovým elementom sú AMP (IMLER 2014; BULET et al. 1999). Väčšina z nich sú indukateľné, nízkomolekulové (< 5 kDa) a vo fyziologických podmienkach kladne nabité molekuly (BULET et al. 1999). V prípade hmyzu s úplnou premenou (kam patrí i *L. sericata*) je syntéza AMP indukovaná v tukovom telese a vo viacerých epitelochoch. Ak sú produkované v tukovom telese, prechádzajú do hemolymfy odkiaľ môžu ľahko difundovať do celého organizmu. Naproti tomu u hmyzu s neúplnou premenou sú AMP produkované krvnými bunkami (hemocytmi) ešte neinfikovaného organizmu a pri infekcii sa vylučujú do hemolymfy (BULET, STÖCKLIN 2005).

Na základe chemickej štruktúry sa AMP hmyzu dajú rozdeliť do niekoľkých skupín (BULET et al. 1999; BULET, STÖCKLIN 2005). Niektoré peptidy či skupiny peptidov sú špecifické voči konkrétnym typom patogénov (napríklad defenzíny), iné vykazujú aktivitu voči širšiemu spektru mikrobov. Napríklad thanatín je účinný voči Gram-pozitívnym aj Gram-negatívnym baktériám, a tiež voči hubám (BULET et al. 1999). Navyše sa zdá, že hmyz je schopný selektívne produkovať tie peptidy, ktoré budú v danej situácii účinné. Tak napríklad u *Drosophila melanogaster*, infekcia entomopatogénnou hubou stimuluje produkciu antifungálnych, no nie antibakteriálnych peptidov (BULET, STÖCKLIN 2005).

Antibakteriálna aktivita môže byť stimulovaná dvomi spôsobmi, a to mechanickým poranením alebo požitím patogénov. Skutočne, poranenie sterilnou ihlou zvyšuje antibakteriálnu aktivitu v hemolymfe lariev *L. sericata* štyrikrát, a použitie infikovanej ihly dokonca 16-krát (HUBERMAN et al. 2007b). Druhý spôsob však lepšie napodobňuje situáciu v ťažko sa hojacej rane. Keď boli larvy inkubované v tekutých suspenziách baktérií *S. aureus* alebo *P. aeruginosa*, antibakteriálne schopnosti ich celotelových extraktov vzrástli v porovnaní s larvami, ktoré do kontaktu s patogénmi neprišli (KAWABATA et al. 2010). S tým súhlasí i expresia lucifenzínu v tukovom teliesku, ktorú prítomnosť mikroorganizmov zvyšuje (VALACHOVÁ et al. 2013).

Naproti tomu, antimikrobiálne vlastnosti ES nezávisia od množstva baktérií v prostredí, t.j. sú udržiavané na konštantnej úrovni (BARNES, GENNARD 2011). Takisto ani expresia lucifenzínu v bunkách slinných žliaz, ktoré sú zdrojom larválnych sekrétov, vôbec nie je prítomnosťou patogénov ovplyvnená (VALACHOVÁ et al. 2013). Imunitný systém lariev *L. sericata* je teda schopný flexibilnej odpovede na prítomnosť patogénnych mikrobov, no antibakteriálna aktivita ES je konštantne vysoká. Tá je pravdepodobne dôsledkom prirodzeného životného prostredia lariev, reprezentovaného rozkladajúcimi sa ostatkami mŕtvych živočíchov (BARNES, GENNARD 2011). Expresia lucifenzínu v slinných žľazách klesá iba v prípade nedostatku potravy (VALACHOVÁ et al. 2013).

5. MOLEKULÁRNO-BIOLOGICKÝ PRÍSTUP

Lucifenzín, doteraz jediný identifikovaný larválny AMP, bol objavený biochemickou cestou. Extrakty z jednotlivých tkanív boli viacnásobne separované pomocou kvapalinovej chromatografie a výsledná frakcia obsahujúca jedinou látku bola analyzovaná metódou proteínového sekvenovania (ČEŘOVSKÝ et al. 2010). O celkom iný prístup sa pokúsili ANDERSEN et al. (2010). Molekulárno-biologickými technikami získali sekvencie tých kódujúcich úsekov, ktorých proteínové produkty sú v larvách sekretované (napríklad aj slinnými žľazami). Takto identifikovali dva antibakteriálne peptidy: homológ sarkotoxínu IIA patriaceho do rodiny antibakteriálnych peptidov attacínov, a defenzín, ktorého sekvencia sa zhodovala s lucifenzínom (Tab. 1). Sarkotoxín IIA bol nájdený v mäsiarke *Sarcophaga peregrina* a podobne ako prvý attacín izolovaný z okáňa *Hyalophora cecropia*, má

schopnosť inhibovať rast Gram-negatívnych baktérií *E. coli*. Predpokladá sa, že inhibuje syntézu bunkovej steny, čo vedie k závažným zmenám v morfológii buniek (ANDO, NATORI 1988; CARLSSON et al. 1998).

ALTINCICEK a VILCINSKAS (2009) použili molekulárno-biologické techniky na charakterizáciu komponentov imunitnej odpovede. V ich experimente mechanicky poranili larvu a navyše ju vystavili bakteriálnej infekcii. Získali sekvencie 65 kódujúcich úsekov génov, ktoré sa po poranení a infekcii indukovali. Medzi nimi identifikovali päť krátkych peptidov s potenciálnou antimikrobiálnou aktivitou (Tab. 1). Tri, zaradujúce sa do rovnakej skupiny AMP (bohatých na aminokyselinu prolín), boli čiastočne podobné známym peptidom z *D. melanogaster*. Obzvlášť jeden z nich bol významne aktívny voči Gram-pozitívnej baktérii *Micrococcus luteus*. Štvrtý z identifikovaných peptidov bol určený ako homológ sapecínu-B zo *S. peregrina*. Tento nový peptid patrí do skupiny defenzínov, no je odlišný od lucifenzínu. A napokon piaty bol príbuzný dipterícínom izolovaným z viacerých druhov hmyzu (*D. melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura*, *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans*, a iné). Prítomnosť dipterícínov potvrdzuje aj čiastočná biochemická analýza (KRUGLIKOVA, CHERNYSH 2011). Zdá sa teda, že či už v sekrétoch, alebo v hemolymfe, larvy bzučivky obsahujú okrem lucifenzínu aj viaceré ďalšie peptidy, vrátane takých, ktoré sú schopné eliminovať aj Gram-negatívne baktérie. Je preto pravdepodobné, že larvy v rámci svojej imunitnej obrany syntetizujú aj tento typ AMP; doteraz však nebol definitívne preukázaný.

Dve uvedené práce ukázali potenciál genomiky v odkrývaní mozaiky imunitnej odpovede. Skutočne, celogenómovou analýzou *D. melanogaster* možno nájsť niekoľko stoviek génov, ktorých expresia je spriahnutá s imunitnou reakciou (ALTINCICEK, VILCINSKAS 2009). Kompletná sekvencia genómu *L. sericata* zatiaľ nie je známa, no bol publikovaný tzv. transkriptóm, t. j. súbor sekvencií kódujúcich úsekov génov, ktoré sú exprimované v slinných žľazách, a to počas rôznych vývinových štádií (SZE et al. 2012). Tento transkriptóm zatiaľ nebol podrobený analýze z hľadiska identifikácie potenciálnych antimikrobiálnych látok proteínovej povahy.

6. TERAPEUTICKÉ VYUŽITIE ANTIMIKROBIÁLNYCH PEPTIDOV A BUDÚCNOSŤ

Objav prvého antibiotika, penicilínu, znamenal revolúciu v medicíne. Dovtedy liečba infikovaných rán spočívala vo vyplachovaní fenolom, ktorý je popri kyselinách a lúhoch stále jednou z najnebezpečnejších chemikálií v laboratóriu. Od čias penicilínu boli objavené či vyvinuté nové a účinnejšie antibiotiká, no napriek tomu sa ich éra, zdá sa, po necelom storočí končí. Dôvodom je vznik multirezistentných kmeňov, po anglicky nazývaných aj „superbugs“, ktoré sú definované ako kmene odolné voči viac ako dvom skupinám antibiotík (PORTO et al. 2012; BALTZER, BROWN 2011). Príčin by sa mohlo nájsť niekoľko, a to či už neuvážené a častokrát i nevhodné používanie antibiotík (vrátane širokospektrálnych) alebo ich prítomnosť

v potravinárskom priemysle a v domácich produktoch (BALTZER, BROWN 2011). Riešenie ponúkajú AMP. Možno ich považovať za prirodzené antibiotiká rastlinnej a živočíšnej ríše (ľudí nevynímajúc), no v porovnaní s tými konvenčnými sú extrémne rýchle; sú schopné usmrtiť patogéna v priebehu niekoľkých minút (BOMAN 2003). Tradičné antibiotiká ako norfloxacín alebo vankomycín potrebujú najmenej štyri, a niekedy dokonca až 24 hodín (KANG et al. 2012). Okrem antimikrobiálneho účinku však u nich boli popísané aj imunomodulačné (napr. indukcia a modulácia prozápalových cytokínov) a protirakovinové vlastnosti (NIJIK, HANCOCK 2009). Niektoré dokonca dokážu neutralizovať imunostimulačné faktory uvoľnené z baktérií (lipopolysacharidy alebo lipoproteíny) a predchádzať tak zápalovým reakciám (SCHUERHOLZ et al. 2012).

S AMP je však spojených aj niekoľko nevýhod. Asi najzávažnejšou je toxicita niektorých peptidov voči cicavčím bunkám, ktorá sa prejavuje hemolýzou, nefrotoxicitou alebo neurotoxicitou (GORDON et al. 2005). Pri prekonávaní takýchto prekážok sa výskum uberať smerom tzv. racionálneho dizajnu, ktorý sa zaoberá hľadaním závislosti medzi štruktúrou a funkciou. Tak napríklad, zvýšenie celkového náboja, pri zachovaní ostatných fyzikálno-chemických vlastností, vedie v prípade peptidu magainínu 2 ku vzniku analógu, ktorý je menej toxický voči krvným bunkám, a zároveň aktívnejší v prípade baktérií (DATHE et al. 2001). Cestou je i príprava hybridných peptidov, ktorých jednotlivé časti majú pôvod v iných organizmoch. Napríklad spojenie častí hmyzích defenzínov z komára *Anopheles gambiae* a z chrobáka *Acrocynus longimanus* dalo vznik antimikrobiálnemu peptidu, ktorý bol trikrát účinnejší ako pôvodný defenzín z komára, a tri- až desaťkrát účinnejší ako vankomycín, konvenčné antibiotikum používané na liečbu MRSA (LANDON et al. 2008). Iným problémom je citlivosť voči proteázam, t.j. enzýmom degradujúcim proteíny a peptidy. Toto je možné vyriešiť zamenou aminokyselín, kde jedným z riešení je zmena priestorovej štruktúry aminokyselín (L-formy za D-formy), no chemické zloženie ostane rovnaké (PORTO et al. 2012).

Závažnou otázkou je i vznik rezistencie. S AMP patogény vo všeobecnosti ťahajú za kratší koniec. Pripisuje sa to ich komplexnému mechanizmu účinku, kedy najprv dochádza k akumulácii peptidov na povrchu bunky (charakterizovanom záporným nábojom), následne k interakcii s bunkovou membránou, preusporiadaniu membrány, translokácii cez ňu, a napokon k samotnému účinku, čo je častokrát lýza bunky (SEO et al. 2012). Boli však popísané prípady, kedy sa rezistencia voči AMP skutočne vyvinula. *S. aureus* dokázal pozmeniť zloženie membrány, čím sa zmenšil jej záporný náboj, čo napokon viedlo k odpudzovaniu kladne nabitých AMP (PESCHEL, COLLINS 2001). V tomto smere bude preto potrebné sa viac ako inokedy poučiť z chýb minulosti. Keďže AMP tvoria súčasť imunitnej ochrany aj u ľudí, vznik rezistentných kmeňov patogénov môže oveľa vážnejšie ohroziť zdravie človeka ako rezistencia na súčasne antibiotiká (BELL, GOUYON 2003).

Úvahy o komerčnom využití AMP v súčasnosti už nie sú iba akademické. Napríklad polymixín B a gramicidín S (paradoxne oba produkty baktérií rodu *Bacillus*) sa úspešne využívajú v terapii infekcií spôsobených Gram-negatívnymi baktériami. Vzhľadom na ich čiastočnú toxicitu i pre človeka, sa však aplikujú iba

povrchovo, a to ako súčasť krémov a roztokov (BALTZER, BROWN 2011; NTWASA et al. 2012). Je pravdepodobné, že s aplikovaním racionálneho dizajnu ich v rozpätí niekoľkých rokov pribudne oveľa viac, najmä ak rýchlosť pribúdania nových antibiotík v súčasnosti nedokáže držať krok s rastúcim množstvom rezistentných kmeňov patogénov (PORTO et al. 2012). Napokon, budúcnosťou tradičných antibiotík môže byť ich kombinácia s AMP. IWASAKI et al. (2007) ukázali, že konvenčné antibiotiká aplikované spolu s analógmi hmyzích defenzínov mali väčšiu účinnosť voči takým patogénom ako je MRSA alebo *P. aeruginosa*. Dôvodom je pravdepodobne tvorba pórov peptidmi, cez ktoré antibiotiká ľahšie prenikali.

A čo z toho všetkého vyplýva pre larválnu terapiu? Multirezistentné kmene komplikujú liečbu aj ťažko sa hojacích chronických rán. Zároveň viaceré štúdie poukazujú na výrazné antimikrobiálne schopnosti lariev a larválnych produktov voči rôznym patogénom, vrátane MRSA. Larvy bzučivky *L. sericata* tak sú potenciálne bohatým zdrojom nových AMP. Hoci zatiaľ jediným charakterizovaným ostáva defenzín lucifenzín, biochemické i molekulárno-biologické metódy naznačujú, že antimikrobiálny arzenál lariev je širší. Navyše, vzhľadom na to, že imunitný systém hmyzu je založený najmä na AMP, predstavujú jeho zástupcovia atraktívnych kandidátov pre hľadanie nových, peptidových antibiotík (NTWASA et al. 2012). Na druhej strane, známym nedostatkom biochirurgických lariev je menšia účinnosť na Gram-negatívne baktérie (STEENVOORDE, JUKEMA 2004; BOWLING et al. 2007). V dnešnej dobe, kedy nie je problém geneticky pozmeniť ani mnohobunkový organizmus, by krok vpred znamenal obohatenie genetickej výbavy lariev o ďalšie AMP, či už pochádzajúce z iných druhov hmyzu alebo i vzdialenejších organizmov.

POĎAKOVANIE

Ďakujeme RNDr. Ivane Valachovej PhD. z Ústavu zoológie SAV a recenzentovi práce za cenné pripomienky k manuskriptu. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Výskum a vývoj nových bioterapeutických metód a ich využitie pri liečbe niektorých závažných ochorení (ITMS: 26240220030), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

- ALTINCICEK B., VILCINSKAS A. 2009. Septic injury-inducible genes in medicinal maggots of the green blow fly *Lucilia sericata*. *Insect Mol Biol* 18(1): 119-125.
- ANDERSEN A.S., SANDVANG D., SCHNORR K.M., KRUSE T., NEVE S., JOERGENSEN B., KARLSMARK T., KROGFELT K.A. 2010. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother* 65(8): 1646-1654.
- ANDO K., NATORI S. 1988. Inhibitory effect of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. *J Biochem* 103(4): 735-739.
- BALTZER S.A., BROWN M.H. 2011. Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20(4): 228-235.

- BARNES K.M., GENNARD D.E. 2011. The effect of bacterially-dense environments on the development and immune defences of the blowfly *Lucilia sericata*. *Physiol Ent* 36(1): 96-100.
- BELL G., GOUYON P.H. 2003. Arming the enemy: the evolution of resistance to self-proteins. *Microbiology* 149(Pt 6): 1367-1375.
- BEXFIELD A., NIGAM Y., THOMAS S., RATCLIFFE N.A. 2004. Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect* 6(14): 1297-1304.
- BEXFIELD A., BOND A.E., ROBERTS E.C., DUDLEY E., NIGAM Y., THOMAS S., NEWTON R.P., RATCLIFFE N.A. 2008. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes Infect* 10(4): 325-333.
- BOMAN H.G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254(3), 197-215.
- BOWLING F.L., SALGAMI E.V., BOULTON A.J. 2007. Larval therapy: a novel treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 30(2): 370-371.
- BULET P., HETRU C., DIMARCO J.L., HOFFMANN D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* 23(4-5): 329-344.
- BULET P., STÖCKLIN R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett* 12(1): 3-11.
- CARLSSON A., NYSTRÖM T., DE COCK H., BENNICHT H. 1998. Attacin - an insect immune protein - binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. *Microbiology* 144(Pt 8): 2179-2188.
- CAZANDER G., PRITCHARD D.I., NIGAM Y., JUNG W., NIBBERING P.H. 2013. Multiple actions of *Lucilia sericata* larvae in hard-to-heal wounds. Larval secretions contain molecules that accelerate wound healing, reduce chronic inflammation and inhibit bacterial infection. *Bioessays* 35(12): 1083-1092.
- CHURCH J.C.T. 2013. Biotherapy - an introduction, pp. 1-4. In: Grassberger M., Sherman R.A., Gileva O.S., Kim C.M.H., Mumcuoglu K.Y. (eds) *Biotherapy - History, Principles and Practice*. Springer.
- COURTENAY M., CHURCH J.C., RYAN T.J. 2000. Larva therapy in wound management. *J R Soc Med* 93(2): 72-74.
- ČAMBAL M., ZONČA P., LABAŠ P., HRBATÝ B., ŠKODA A., SATKO I. 2013. Larválna terapia a chronické nehojace sa rany. *Slov chir* 10(1): 8-11.
- ČEŘOVSKÝ V., ŽĎÁREK J., FUČÍK V., MONINCOVÁ L., VOBURKA Z., BÉM R. 2010. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci* 67(3): 455-466.
- DATHE M., NIKOLENKO H., MEYER J., BEYERMANN M., BIENERT M. 2001. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 501(2-3): 146-150.
- DAVYDOV L. 2011. Maggot therapy in wound management in modern era and a review of published literature. *J Pharm Pract* 24(1): 89-93.
- GORDON Y.J., ROMANOWSKI E.G., MCDERMOTT A.M. 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res* 30(7): 505-515.
- GUO S., DIPIETRO L.A. 2010. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 89(3):219-229.

- HOFMAN D. 2007. The autolytic debridement of venous leg ulcers. *Wound Essentials* 2: 68-73.
- HUBERMAN L., GOLLOP N., MUMCUOGLU K.Y., BREUER E., BHUSARE S.R., SHAI Y., GALUN R. 2007a. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 21(2): 127-131.
- HUBERMAN L., GOLLOP N., MUMCUOGLU K.Y., BLOCK C., GALUN R. 2007b. Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J Wound Care* 16(3): 123-127.
- CHAN D.C., FONG D.H., LEUNG J.Y., PATIL N.G., LEUNG G.K. 2007. Maggot debridement therapy in chronic wound care. *Hong Kong Med J* 13(5): 382-386.
- IMLER J.L. 2014. Overview of *Drosophila* immunity: A historical perspective. *Dev Comp Immunol* 42(1): 3-15.
- IWASAKI T., SAIDO-SAKANAKA H., ASAOKA A., TAYLOR D., ISHIBASHI J., YAMAKAWA M. 2007. In vitro activity of diastereomeric antimicrobial peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Insect Biotechnol Sericol* 76(1): 25-29.
- KANG S.J., KIM D.H., MISHIG-OCHIR T., LEE B.J. 2012. Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. *Arch Pharm Res* 35(3): 409-413.
- KAWABATA T., MITSUI H., YOKOTA K., ISHINO K., OGUMA K., SANO S. 2010. Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. *Med Vet Entomol* 24(4): 375-381.
- KERRIDGE A., LAPPIN-SCOTT H., STEVENS J.R. 2005. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 19(3): 333-337.
- KRUGLIKOVA A.A., CHERNYSH S.I. 2011. Antimicrobial compounds from the excretions of surgical maggots, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). *Entomol Rev* 91(7): 813-819.
- LANDON C., BARBAULT F., LEGRAIN M., GUENNEUGUES M., VOVELLE F. 2008. Rational design of peptides active against the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*. *Proteins* 72(1): 229-239.
- MUMCUOGLU K.Y., MILLER J., MUMCUOGLU M., FRIGER M., TARSHIS M. 2001. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 38(2): 161-166.
- NIJNIK A., HANCOCK R. 2009. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J* 2: e1.
- NTWASA M., GOTO A., KURATA S. 2012. Coleopteran antimicrobial peptides: prospects for clinical applications. *Int J Microbiol* 2012: Article ID 101989.
- PARNÉS A., LAGAN K.M. 2007. Larval therapy in wound management: a review. *Int J Clin Pract* 61(3): 488-493.
- PESCHEL A., COLLINS L.V. 2001. Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* 22(10): 1651-1659.
- PORTO W.F., SILVA O.N., FRANCO O.L. 2012. Prediction and rational design of antimicrobial peptides, pp. 377-396. In: Faraggi E. (ed) *Protein Structure*. InTech.
- SEO M.D., WON H.S., KIM J.H., MISHIG-OCHIR T., LEE B.J. 2012. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules* 17(10): 12276-12286.
- SHERMAN R.A. 2002. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 10(4): 208-214.

- SHERMAN R.A. 2003. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care* 26(2): 446-451.
- SCHUERHOLZ T., BRANDENBURG K., MARX G. 2012. Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis. *Crit Care* 16(2): 207.
- STEENVOORDE P., JUKEMA G.N. 2004. The antimicrobial activity of maggots: in-vivo results. *J Tissue Viability* 14(3): 97-101.
- SZE S.H., DUNHAM J.P., CAREY B., CHANG P.L., LI F., EDMAN R.M., FJELDSTED C., SCOTT M.J., NUZHIDIN S.V., TARONE A.M. 2012. A de novo transcriptome assembly of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) with predicted alternative splices, single nucleotide polymorphisms and transcript expression estimates. *Insect Mol Biol* 21(2): 205-221.
- VALACHOVÁ I., BOHOVÁ J., PÁLOŠOVÁ Z., TAKÁČ P., KOZÁNEK M., MAJTÁN J. 2013. Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments. *Cell Tissue Res* 353(1): 165-171.
- VAN DER PLAS M.J., JUKEMA G.N., WAI S.W., DOGTEROM-BALLERING H.C., LAGENDIJK E.L., VAN GULPEN C., VAN DISSEL J.T., BLOEMBERG G.V., NIBBERING P.H. 2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 61(1): 117-122.
- WHITAKER I.S., TWINE C., WHITAKER M.J., WELCK M., BROWN C.S., SHANDALL A. 2007. Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgrad Med J* 83(980): 409-413.
- WOLLINA U., KARTE K., HEROLD C., LOOKS A. 2000. Biosurgery in wound healing - the renaissance of maggot therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 14(4): 285-289.
- ZARCHI K., JEMEC G.B. 2012. The efficacy of maggot debridement therapy - a review of comparative clinical trials. *Int Wound J* 9(5): 469-477.

Tabuľka 1. Antimikrobiálne peptidy produkované[‡] larvami bzučivky *Lucilia sericata*.

Table 1. Antimicrobial peptides produced[§] by maggots of the common green bottle fly *Lucilia sericata*.

antimikrobiálny peptid	kategória AMP	miesto identifikácie	spôsob identifikácie	aktivity na	literatúra
AMP veľkosťou podobné dipterícínom z <i>Calliphora vicina</i>	gloveríny (dipterícíny)	ES	hmotnostná spektrometria po chromatografickej separácii	Gram-negatívne baktérie	KRUGLIKOVA a CHERNYSH (2011)
AMP veľkosťou podobné defenzínom z <i>Calliphora vicina</i>	defenzíny	ES	hmotnostná spektrometria po chromatografickej separácii	Gram-positívne baktérie	KRUGLIKOVA a CHERNYSH (2011)
lucifenzín	defenzíny	ES, črevo, slinné žľazy, tukové teliesko, hemolymfa	hmotnostná spektrometria a proteínové sekvenovanie po chromatografickej separácii	Gram-positívne baktérie	ČEŘOVSKÝ et al. (2010)
		materiál bol izolovaný z celého tela	sekvenovanie prepisov exprimujúcich sa (aktívnych) génov	n.u.	ANDERSEN et al. (2010)
AMP podobný sarkotoxínu IIA zo <i>Sarcophaga peregrina</i>	gloveríny (attacíny)	materiál bol izolovaný z celého tela	sekvenovanie prepisov exprimujúcich sa (aktívnych) génov	n.u.	ANDERSEN et al. (2010)
AMP podobné drosocínu a metchnikovínu z <i>Drosophila melanogaster</i>	AMP bohaté na aminokyselinu prolín	materiál bol izolovaný z celého tela	sekvenovanie prepisov génov po stimulácii bakteriálnymi LPS	Gram-positívne baktérie	ALTINCICEK a VILCINSKAS (2009)
AMP podobný sapecínu B zo <i>Sarcophaga peregrina</i>	defenzíny	materiál bol izolovaný z celého tela	sekvenovanie prepisov génov po stimulácii bakteriálnymi LPS	n.u.	ALTINCICEK a VILCINSKAS (2009)
AMP podobný dipterícínom z viacerých druhov hmyzu	gloveríny (dipterícíny)	materiál bol izolovaný z celého tela	sekvenovanie prepisov génov po stimulácii bakteriálnymi LPS	n.u.	ALTINCICEK a VILCINSKAS (2009)

Vysvetlivky: n.u. = aktivita u *L. sericata* nebola určovaná

LPS = lipopolysacharidy (štruktúry na povrchu Gram-negatívnych baktérií, stimuluje imunitný systém živočíchov)

[‡] doteraz bol bližšie charakterizovaný iba lucifenzín

[§] only lucifensin has been adequately characterized up to now