



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Doroteja Cindrić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ANTIMIKROBNI PEPTIDI KAO TERAPEUTICI**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2019.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. lipnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

12. srpnja 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. KLASIFIKACIJA I ULOGA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA .....	3
§ 3. STRUKTURA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA.....	6
§ 4. DJELOVANJE NEKIH ANTIMIKROBNIH PEPTIDA.....	9
4.1. LL - 37 .....	11
4.2. Protegrin -1 .....	12
4.3. Apidecin.....	13
4.4. HP ( 2 – 20 ).....	15
4.5. Mikrocin S.....	16
4.6. Neki <i>De – novo</i> sintetizirani antimikrobni peptidi .....	17
4.6.1. <i>APKAMKLLKLLKLLQKKGI</i> peptid.....	17
4.6.2. <i>Peptidi STAMP</i> .....	18
4.6.3. <i>CPP – EGS</i> peptidi .....	20
§ 5. PRIJENOS ANTIMIKROBNIH PEPTIDA U ORGANIZMU .....	21
5.1. Neki tipovi nano - čestica .....	22
5.1.1. <i>Liposomi</i> .....	22
5.1.2. <i>Polimerne strukture</i> .....	23
5.1.3. <i>Ugljikove nano - tubule</i> .....	24
5.2. Molekule koje omogućuju uspješan prijenos antimikrobnih peptida .....	25
5.2.1. <i>Antitijela</i> .....	26
5.2.2. <i>Ugljikohidrati</i> .....	27
§ 6. ZAKLJUČAK.....	28
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	29



## § Sažetak

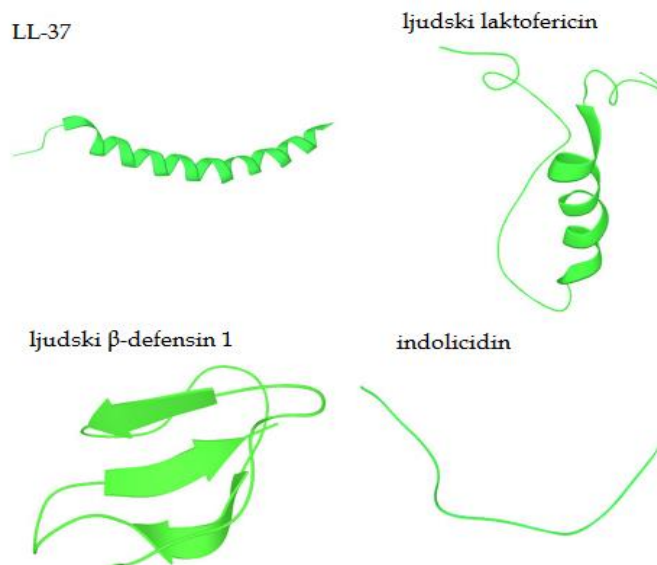
Antimikrobni peptidi su male i, uglavnom, pozitivno nabijene molekule koje se nalaze u raznim oblicima života, od prokariota do eukariota. Mogu imati prirodno podrijetlo, iz prokariotskih i eukariotskih stanica, ali mogu se dizajnirati i sintetizirati u laboratoriju. Njihovo djelovanje može biti direktno, a to podrazumijeva njihovo vezanje na staničnu membranu bakterije i ulazak u samu bakteriju sa ciljem njezinog uništavanja, dok indirektno djelovanje antimikrobnih peptida podrazumijeva njihovo sudjelovanje u imunološkim obrambenim procesima. S obzirom na to da su pojedine bakterije otporne na određene antimikrobne peptide, uvode se razne modifikacije na samim peptidima kako bi se poboljšalo njihovo djelovanje. Kako bi se određeni sintetizirani antimikrobni peptidi dostavili na određeno mjesto u organizmu, moraju se prenijeti pomoću nanometarskih sustava kao što su recimo liposomi. Kada bi antimikrobne peptide direktno unijeli u organizam, došlo bi do njihove hidrolize uslijed djelovanja proteolitičkih enzima. Sintetiziralo se nekoliko takvih peptida i neki od njih podvrgnuti su istraživanjima kako bi se analiziralo njihovo djelovanje i na kraju odobrilo njihova primjena u terapijske svrhe. U tu svrhu, razmatrale su se prednosti i nedostaci takvih peptida. Neki od sintetiziranih peptida i mehanizam njihovog djelovanja bit će spomenuti u daljnjem tekstu.





## § 1. UVOD

Antimikrobni peptidi (AMP) male su, općenito kationske molekule koje se sastoje od 10 do 50 aminokiselina. Nađeni su u svim organizmima i pokazuju izvanrednu raznolikost u strukturi i funkciji. Naime, postoji ribosomska sinteza antimikrobnih peptida koja je prisutna u svim organizmima i neribosomska koja je karakteristična samo za bakterije. U našem organizmu AMP-ovi su pohranjeni u stanicama kože (epitelnim stanicama) i u stanicama sluznice.<sup>1</sup> Antimikrobni peptidi imaju izrazito veliku aktivnost protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.<sup>2</sup> Antimikrobnim peptidima meta može biti bakterijska membrana, ali i određena molekula unutar same bakterije. Jedan od mehanizama kojim ti peptidi ulaze u samu bakteriju je perturbacija bakterijske membrane, odnosno dolazi do inverzije polarizacije membranskog potencijala (negativni naboj više nije sa unutrašnje strane membrane nego sa vanjske). Postoje i slučajevi u kojima se antimikrobni peptidi translociraju u bakteriju bez uništavanja same membrane, pri čemu se vežu za određenu molekulu u stanici. Primjer ljudskog antimikrobnog peptida je katelicidin (LL-37) koji se nalazi u leukocitima.<sup>5</sup> Osim antimikrobne aktivnosti, takvi peptidi imaju veliku ulogu u stvaranju i održavanju imuniteta, u sprječavanju upalnih procesa te u zacjeljivanju rana.<sup>1</sup> Prvo otkriće prirodnog antimikrobnog peptida dogodilo se 1939. kada je Dubos izolirao gramicidin iz tla koji proizvodi bakterija *Bacillus brevis*.<sup>3</sup> Gramicidin je pokazao antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija u *in vitro* i u *in vivo* uvjetima.<sup>3</sup> Kasnije je pokazano kako gramicidin djeluje protiv infekcije rana kod gvinejske svinje.<sup>6</sup> Antimikrobni peptidi prikazuju se kao sekundarne strukture, kao što su  $\alpha$ -zavojnica,  $\beta$ -ploča i kao razmotana struktura u vodenoj otopini (neuređena struktura).



Slika 1. Četiri kategorije sekundarne strukture AMP-a. Adaptirano prema Mahlapuu M., Håkansson J., Ringstad L. i Björn C. (2016) Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:194. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194.

## § 2. KLASIFIKACIJA I ULOGA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA

Antimikrobni peptidi spojevi su koje se krenulo detaljno proučavati nakon spoznaje da su mnoge bakterije otporne na antibiotike. Došlo je do potrebe za modifikacijom postojećih antibiotika i sintetiziranjem novih spojeva – peptida koji će uništiti određene bakterije. Također, u svakom organizmu već postoje određeni antimikrobni peptidi koji štite sam organizam. S obzirom na metu na koju napadaju, antimikrobni peptidi mogu se podijeliti na antivirusne, antifungalne, antiparazitske i antibakterijske. U daljnjem tekstu bavit ćemo se klasifikacijom peptida koji štite organizme od bakterija, antibakterijskim peptidima.

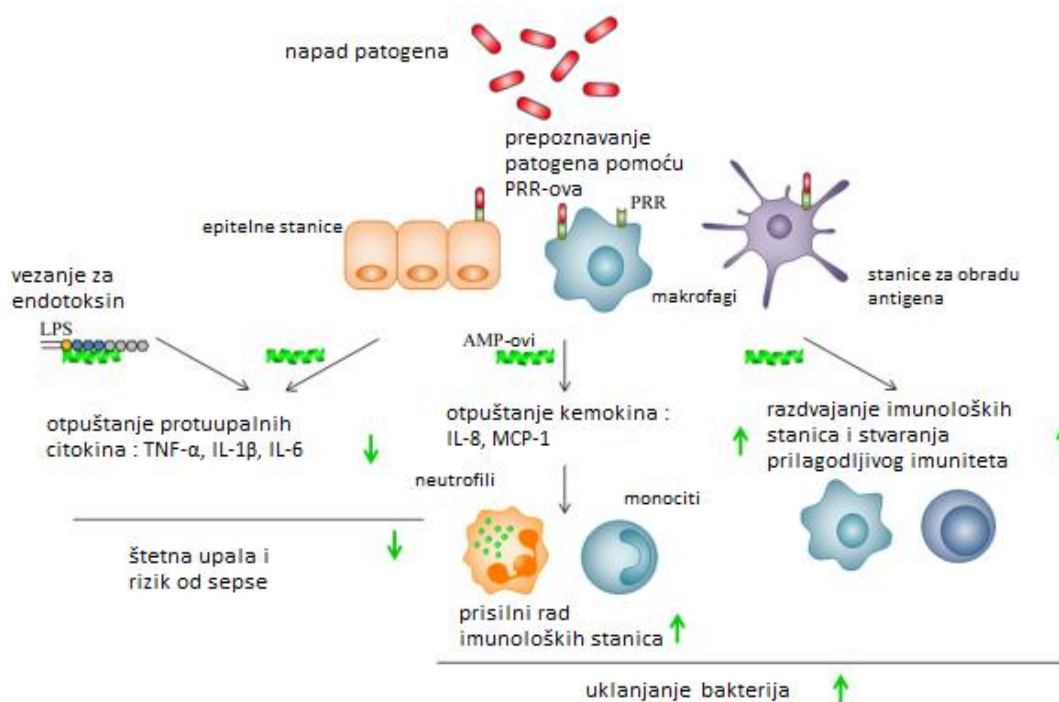
Prirodni antimikrobni peptidi sintetiziraju se na ribosomima, prijenosom genetičke informacije sa glasničke RNA (u svim organizmima) ili sintezom koja ne uključuje ribosome, u bakterijama.<sup>7</sup> Antimikrobni peptidi sintetizirani na ribosomima imaju veću ulogu u obrani organizma – u stvaranju imuniteta, nego u samom uništavanju bakterija.<sup>2</sup> Ovdje je bitno naglasiti da mnogi sintetski antimikrobni peptidi mogu narušiti imunitet tako što neće uništiti samo one bakterije koje nisu dobre za organizam, već mogu uništiti i one dobre bakterije koje su bitne za stvaranje imuniteta i koje su zapravo bitne za otpornost našeg organizma. Zbog toga je bitno koristiti sintetske antimikrobne peptide samo u slučajevima kada je to nužno, u suprotnom, dolazi do znatnog povećanja otpornosti bakterija na određene antibiotike. Mnogi antimikrobni peptidi mogu biti sintetizirani i u inaktivnom obliku, a aktiviraju se djelovanjem proteaza kada je to potrebno – poslat će se signal da se određeni peptidi oslobode iz granula u kojima su pohranjeni i aktiviraju se cijepanjem pomoću proteaza.<sup>2</sup> Na temelju strukture, antimikrobni peptidi dijele se na  $\alpha$ -zavojnicu (npr. LL-37),  $\beta$ -ploču (npr. ljudski  $\beta$ -defensin 1) i neuređenu strukturu (npr. indolicidin), kao što to prikazuje i slika 1.

Što se tiče samog postojanja antimikrobnih peptida, oni mogu postojati sami kako bi uništili bakterije, mogu biti u kombinaciji sa već postojećim antibioticima, zbog istog razloga kao u prethodnom slučaju i već je rečeno da mnogi od njih imaju i bitnu ulogu u stvaranju i održavanju imuniteta.<sup>1</sup> Također se koriste još i kako bi neutralizirali endotoksine, nakon smrti bakterije, i na taj način spriječili septički šok.<sup>1</sup> Još jedna od prednosti njihovog korištenja izrazito je brzo djelovanje i učinkovitost.

Međutim, postoje i brojni nedostaci vezani uz same antimikrobne peptide koji djeluju solistički: skupa sinteza, skupa visoka proizvodnja, mogućnost toksičnosti, reducirana aktivnost zbog krvnog seruma, određenih soli i pH vrijednosti, osjetljivost na proteaze, osjetljivost i alergije organizma nakon brojnog unošenja, otpornost bakterija, remećenje nekih bioloških funkcija, farmakokinetički i farmakodinamički problemi.<sup>1</sup> Sa farmakokinetičkog gledišta, može doći do problema u kojim intervalima i s kojim dozama upotrijebiti lijek s ciljem postizanja i održavanja potrebne koncentracije na mjestu djelovanja. Sa farmakodinamičkog gledišta, može doći do problema u odnosu između koncentracije i učinka lijeka.

Antimikrobni peptidi djeluju tako da razaraju bakterijsku membranu i pri tome ulaze u samu bakteriju kako bi inhibirali njezino djelovanje ili im je cilj sama bakterijska membrana. Modeli koji opisuju razaranje bakterijske membrane su model tepiha, bačvasti model i model toroidalne pore, a translokacija AMP-ova objašnjava njihovu penetraciju kroz membranu i ulazak u bakteriju. O pojedinom modelu i mehanizmu djelovanja AMP-ova bit će u 4. cjelini. Glavne skupine ljudskih antimikrobnih peptida koje su istražene su katelicidini i defensini, a proučen je i ljudski laktofericin. Jedini ljudski katelicidin (LL-37) sintetizira se u inaktivnom obliku na C-kraju antimikrobnog proteina hCAP18, u neutrofilnim i epitelnim stanicama.<sup>8</sup> Lektifericin također se sintetizira u inaktivnom obliku i aktivira proteolitički iz glikoproteina laktoferina, a nalazi se u mlijeku i egzokrinim žlijezdama.<sup>9,10</sup> Defensini su peptidi strukture  $\beta$ -ploče koji se sintetiziraju u inaktivnom obliku u neutrofilima, makrofagima i epitelnim stanicama.<sup>8,11</sup>

Antimikrobni peptidi kao stimulansi imuniteta funkcioniraju tako što uklanjaju receptore TLR, a to su receptori za određene patogene koji napadaju naš organizam. Osim što mogu ukloniti spomenute receptore, mogu spriječiti proizvodnju citokina koji bi se lučili uslijed infekcije kao odgovor na tu infekciju, odnosno odgovor na vezanje bakterije, što prikazuje i slika 2. Kao primjer takvog peptida, može se navesti LL-37 koji se veže na receptor LPS (TLR4) epitelne stanice i na taj način ga inhibira jer nema mogućnosti izlučivanja određenih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  te kemokina IL-8 iz makrofaga).<sup>2</sup> Kemokini su mali citokini koji su tijekom određene upale uključeni u kemotaksiju (usmjeravanje gibanja stanica prema kemijskim tvarima u tkivu). Spomenuti peptid također se može vezati na određeni antigen.



Slika 2. Shematski prikaz imunomodulatorne aktivnosti AMP-ova. Adaptirano prema Mahlapuu M., Håkansson J., Ringstad L. i Björn C. (2016) Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:194. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194

### § 3. STRUKTURA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA

Antimikrobni peptidi posjeduju nekoliko strukturnih karakteristika neophodnih za njihovu aktivnost. Brojne su kombinacije aminokiselina od kojih su ti peptidi sastavljeni, a neke od struktura određenih peptida bit će detaljnije i opisane. Na početku je odmah bitno naglasiti da se radi o pozitivno nabijenim vrstama koje onda izuzetno dobro reagiraju sa negativno nabijenim membranama bakterija.

Antimikrobni peptidi male su molekule, a to znači da se sastoje od svega 10-50 aminokiselina. Već je spomenuto da su pozitivno nabijene, a ukupni naboj može varirati od +2 do +11.<sup>2</sup> Prema tome, možemo zaključiti da su u većini prisutne aminokiseline lizin i arginin zbog svog pozitivnog naboja pri fiziološkom pH, a u kiselim uvjetima pozitivnom naboju može doprinijeti i histidin. Velik dio strukture zauzimaju i hidrofobne aminokiseline kako bi antimikrobni peptidi lakše ostvarili interakciju sa fosfolipidnim dvoslojem određene stanične membrane. Temeljna struktura koja zapravo opisuje naše peptide je sekundarna struktura pod kojom podrazumijevamo  $\alpha$ -zavojnica,  $\beta$ -ploču ili njihovu kombinaciju. Takve strukture zapravo se formiraju tek pri kontaktu samog peptida sa bakterijskom membranom, u suprotnom su peptidi razmotani (kada su slobodni, u vodenoj otopini).<sup>3</sup> Antimikrobni peptidi mogu postojati u obliku ukosnice i petlje, pri čemu su onda stabilizirani disulfidnim mostovima, a njima mogu biti stabilizirane i  $\beta$ -ploče. Vrlo bitan stabilizacijski faktor ovih peptida je amfipatski karakter, ali naravno da su tu dosta bitni i dinamična konformacija, hidrofobnost, naboj i sekundarna struktura.<sup>3</sup> Amfipatski karakter ostvaruje se tek u dodiru samog peptida sa bakterijskom membranom.<sup>11,12</sup> Svi su ti faktori na neki način povezani i u određenom su međusobnom odnosu. Uspoređujući  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -ploče, dokazano je da su  $\beta$ -ploče stabilnije u vodenoj otopini i prilikom njihove interakcije sa bakterijskom membranom ne dolazi do značajnijih promjena u njihovoj konformaciji, kao što je to slučaj kod  $\alpha$ -zavojnice.<sup>2</sup> Najpoznatiji antimikrobni peptidi koji imaju strukturu  $\beta$ -ploče su defensini. Kod već spomenutog ljudskog antimikrobnog peptida LL-37, broj 37 odnosi se na broj aminokiselina koje čine taj peptid. Postoje derivati peptida LL-37 i to su peptidi čiji je minimalni broj aminokiselina 20, a maksimalni broj je 38 (LL-20 – LL-38), kao što se može vidjeti i u tablici 1. Prva dva slova u nazivu peptida (LL) označavaju prve dvije aminokiseline koje grade peptid (aminokiseline na N-kraju), i to su dva lizina. Antimikrobni peptidi čija je struktura

kombinacija  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -ploče sastoje se uglavnom od arginina, prolina, triptofana i histidina.<sup>13,14</sup>

S obzirom na podložnost antimikrobnih peptida proteolitičkoj degradaciji, dolazi do njihove ciklizacije, do raznih modifikacija, poput umetanja D-aminokiseline, umetanja sintetskih analoga određenih aminokiselina, označavanja njihovih N- i C-krajeva hidrofobnim aminokiselinama ili je prisutno N-acetiliranje, C-amidacija i označavanje N-kraja piroglutamatom.

Tablica 1. Aminokiselinski sastav peptida LL-37 i njegovih derivata. Tablica je napravljena prema Kang H.-K., Kim C., Ho Seo C. i Park Y. (2017.) The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs) : a patent review. Front. J. Microbiol. Vol. 55, No. 1, pp. 1–12. doi : 10.1007/s12275-017-6452-1.

Peptid	Aminokiselinski sastav peptida
LL-38	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTESS
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
LL-36	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE
LL-35	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRT
LL-34	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPR
LL-33	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVP
LL-32	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV
LL-31	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL
LL-30	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN
LL-29	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR
LL-28	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFL
LL-27	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDF
LL-26	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKD
LL-25	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIK
LL-24	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRI
LL-23	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQR
LL-22	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQ
LL-21	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIV
LL-20	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRI



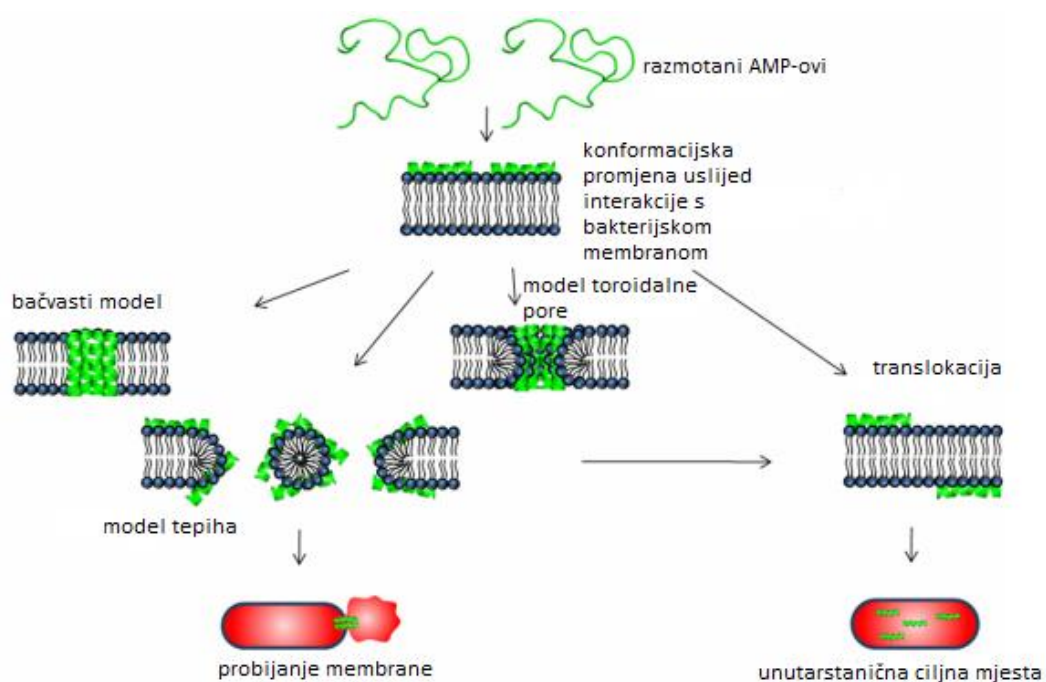
## § 4. PRIMJERI DJELOVANJA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA

Poznata su dva mehanizma djelovanja antimikrobnih peptida, a to su razgradnja stanične membrane i ulazak u stanicu preko membrane, ali bez njezine degradacije. Ulaskom u stanicu, antimikrobni peptid veže se za određenu molekulu čime će utjecati na vijabilnost te stanice u kojoj se nalazi, ali ciljno mjesto antimikrobnog peptida može biti i sama bakterijska membrana.

Kako bi antimikrobni peptid uopće mogao reagirati s bakterijskom membranom, mora doći do određenih interakcija, a pri tome se uglavnom misli na elektrostatske interakcije. Takav tip interakcija moguć je budući da se radi o pozitivno nabijenim antimikrobnim peptidima i negativno nabijenoj membrani. Membrana Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija negativno je nabijena zbog raznih molekula koje sadrži, kao što su na primjer određeni fosfolipidi koji će biti spomenuti u daljnjem tekstu. Prednost antimikrobnih peptida je u njihovom izbjegavanju ljudskih stanica prilikom konzumacije određenog lijeka, odnosno prilikom unošenja određenog antimikrobnog peptida u organizam. Naime, membrane ljudskih stanica nisu negativno nabijene jer su građene od fosfolipida kojima je ukupni naboj 0 i prema tome, one ne mogu ostvariti elektrostatske interakcije sa pozitivno nabijenim antimikrobnim peptidima, mogu jedino ostvariti hidrofobne interakcije koje su puno slabije od elektrostatskih. Također, u membranama ljudskih stanica nalazi se kolesterol koji reducira aktivnost antimikrobnih peptida i tako stabilizira fosfolipidni dvosloj.<sup>15</sup> Bakterijske stanice posjeduju transmembranski potencijal između -130 i -150 mV, za razliku od stanica sisavaca gdje ta vrijednost ide od -90 do -110 mV.<sup>12,16</sup> Na taj način postiže se selektivnost i lijek će djelovati samo na bakterije.

Vanjska membrana Gram-negativnih bakterija stabilizirana je kalcijevim i magnezijevim kationima, odnosno stabilizirani su lipopolisaharidi koji se nalaze unutar membrane. Antimikrobni peptidi u mogućnosti su proći kroz membranu na način da dospiju na mjesta na kojima se nalaze kalcijevi i magnezijevi kationi, pri čemu stvaraju pukotine i permeabiliziraju vanjsku membranu. Pri interakciji samih peptida s membranom, nabijene skupine peptida reagirat će s hidrofilnim dijelovima fosfolipida (polarnim glavama), a hidrofobni dijelovi peptida reagirat će s hidrofobnim dijelovima fosfolipidnog dvosloja (ugljikovodičnim lancima fosfolipida).<sup>2</sup> Pri ulasku u stanicu, peptidi će inhibirati određene molekule i na taj način spriječiti bakterijsko djelovanje, a inhibirani mogu biti procesi vezani uz molekule DNA i RNA,

razni enzimi, može biti inhibirana sinteza proteina ili polisaharida koji grade membranu. Dakle, ovaj model podrazumijeva translokaciju antimikrobnih peptida preko vanjske membrane bakterija, bez razaranja membrane. Prema bačvastom modelu, antimikrobni peptidi učahure se unutar fosfolipidnog dvosloja na način da su hidrofobni dijelovi peptida okrenuti prema dvosloju, a hidrofilni dijelovi nalaze se unutar same pore. Prema modelu toroidalne pore, dolazak peptida uzrokuje kontinuirano savijanje fosfolipida, tako da su njihove polarne glave okrenute prema peptidima koji trebaju proći kroz membranu, i formiranje procjepa za prolazak tog peptida. Prema modelu tepiha, dolazak antimikrobnih peptida uzrokuje toliku tenziju u bakterijskoj membrani da će doći do cijepanja same membrane i formiranja micela.<sup>2</sup> Svi spomenuti modeli prikazani su na slici 3. Ulaskom AMP-ova u bakteriju, može se inhibirati sinteza određenih proteina, može doći do inhibicije nekih enzima (proteaza), a može se aktivirati i protein autolizin koji će uzrokovati raspad cijele bakterije.



Slika 3. Shematski prikaz ubijanja bakterija pomoću antimikrobnih peptida. Adaptirano prema Mahlapuu M., Håkansson J., Ringstad L. i Björn C. (2016) Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:194. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194.

#### 4.1. LL – 37

Ulaskom antimikrobnih peptida u bakteriju doći će do njihovog vezanja na stanične polianione, kao što su DNA i RNA, i na taj način mogu inhibirati procese povezane s ovim molekulama. LL-37 ljudski je antimikrobni peptid koji uzrokuje depolarizaciju bakterijske membrane, a time i njezinu razgradnju, nakon čega ulazi u bakteriju i utječe na njezinu vijabilnost.

Interakcija antimikrobnog peptida LL-37 i bakterijske membrane zasniva se na elektrostatskim interakcijama s obzirom na to da je LL-37 pozitivno nabijen, a pojedine molekule (fosfolipidi) u membranama Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija negativno su nabijene, kao na primjer, fosfatidil-serin i fosfatidil-glicerol.<sup>12,17</sup> U membranama Gram-negativnih bakterija nalaze se još negativno nabijeni lipopolisaharidi, a stanična stijenka Gram-pozitivnih bakterija ima negativno nabijene teikoične kiseline.<sup>8,17</sup> S obzirom na to da u okviru vanjske strane citoplazmatske membrane ljudskih stanica dominiraju fosfatidil-etanolamin, fosfatidil-kolin i sfingomijelin, koji su zwitterioni, nema opasnosti da peptid LL-37 razori takve stanice.<sup>12,17</sup> S unutarnje strane membrane, koja je okrenuta prema citoplazmi, nalaze se negativno nabijene molekule. S obzirom da je vanjskom dijelu membrane ljudskih stanica (dio membrane okrenut prema međustaničnom prostoru) ukupni naboj 0, interakcija između LL-37 i dotične membrane bit će slabija, ali će je ipak biti, ostvarivat će se hidrofobne interakcije. Prilikom određene upale ili obnavljanja tkiva prilikom regeneracije, LL-37 utječe na proliferaciju ljudskih stanica (uzastopnog stvaranja novih stanica tijekom stvaranja novog tkiva).<sup>3</sup> Sintetiziran je i derivat ovog peptida koji je nazvan P10 i radi se o strukturi amfipatske  $\alpha$ -zavojnice.<sup>3</sup> Ovaj modificirani protein pokazao se uspješnijim od LL-37 u slučaju narušavanja membrane bakterije *Staphylococcus aureus*, u 99%-tnoj inhibitornoj koncentraciji (IC<sub>99</sub>) koja se kreće od 0,8 do 3,2  $\mu\text{M}$ .<sup>3</sup> Pokazao se dosta korisnim i zbog neutralizacije bakterijskih endotoksina, poput peptidoglikana, kao i zbog redukcije staničnog odgovora na infekciju.<sup>3</sup>

## 4.2. Protegrin-1

Protegrin-1 je peptid koji se sastoji od 18 aminokiselina (RGGRLCYCRRRFCVVCVGR), a aminokiselina koja prevladava je arginin, ali sadržava i četiri cisteina, odnosno dva disulfidna mosta pomoću kojih je kovalentno povezana (stabilizirana)  $\beta$ -ukosnica.<sup>3</sup> Radi se također o prirodnom antimikrobnom peptidu, o ljudskom antimikrobnom peptidu prema kojemu je sintetiziran umjetni antimikrobni peptid Iseganan (IB-367).

Poput antimikrobnog peptida LL-37, protegrin-1 penetrira u citoplazmu bakterijske stanice, nakon što se veže na fosfolipidni dvosloj, razaranjem bakterijske membrane kreiranjem pore.<sup>3</sup> Međutim, protegrin-1 kao monomer nije stabilan u vodenoj otopini u *in vivo* uvjetima pa je sintetiziran oligomer topljiv u vodi pri čemu su monomeri, protegrin-1 – protegrin-5 (tablica 2.), povezani kovalentnom vezom.<sup>3</sup>

Tablica 2. Sekvence protegrina. Tablica je napravljena prema Kang H.-K., Kim C., Ho Seo C. i Park Y. (2017.) The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs) : a patent review. Front. J. Microbiol. Vol. 55, No. 1, pp. 1–12. doi : 10.1007/s12275-017-6452-1.

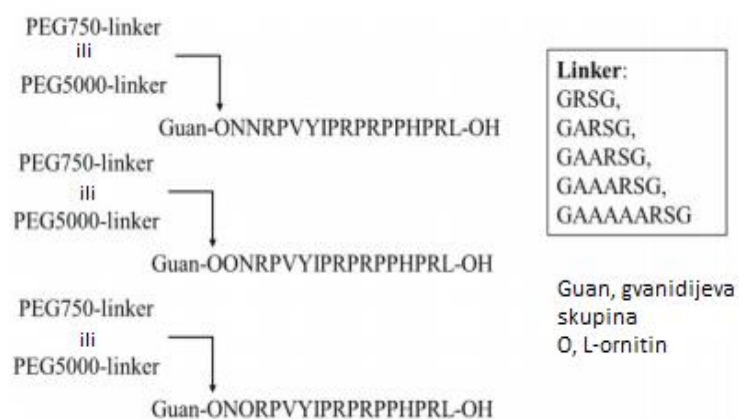
Ime	Sekvenca
Protegrin-1	NH <sub>2</sub> -RGGRLCYCRRRFCVVCVGR-NH <sub>2</sub>
Protegrin-2	NH <sub>2</sub> -RGGRLCYCRRRFCICV-NH <sub>2</sub>
Protegrin-3	NH <sub>2</sub> -RGGGLCYCRRRFCVVCVGRG-NH <sub>2</sub>
Protegrin-4	NH <sub>2</sub> -RGGGLCYCRGWICFCVVCVGRG-NH <sub>2</sub>
Protegrin-5	NH <sub>2</sub> -RGGRLCYCRPRFCVVCVGR-NH <sub>2</sub>
Protegrin	METQRASLCLGRWSLWLLLGLVVPASAQA LSYREAVLRAVDRLNEQSSEANLYRLELDQ PPKADEDPGTPKPVSTVTVKTVCPTRQPP ELCDFKENGVRVKQCVTVTLTDQIKDPLDITC NEVQGV <u>RGGRLCYCRPRFCVVCVGR</u> -NH <sub>2</sub>

### 4.3. Apidecin

Apidecin (GNNRPVYIPQPRPPHPRL) je mali peptid izoliran iz hemolimfe pčele *Apis mellifera* inficirane bakterijom i radi se o peptidu bogatom aminokiselinom prolinom koji ima tri vrste, a to su HbIa, HbIb i HbII.<sup>3</sup> Svaki od njih ima gotovo jednak sastav aminokiselina na svom C-kraju (PRPPHPRL/I), a N-kraj odgovoran je za antibakterijsku aktivnost i aminokiseline na tom kraju variraju.

Apidecini imaju mogućnost ubijanja Gram-negativnih bakterija. Oni se vežu na bakterijsku membranu pri čemu se translociraju u citosol same bakterije i vežu se na točno određeni protein, u većini slučajeva za protein Hsp – DnaK, po čemu su i specifični.<sup>3</sup> Apidecin se najprije nespecifično veže za vanjsku membranu bakterije, nakon čega dopijeva u međumembranski prostor, a nakon nespecifičnog vezanja, slijedi specifično vezanje apidecina za transporter koji se nalazi na unutarnjoj membrani i koji omogućuje konačni prolaz apidecina u bakteriju i vezanje na DnaK.<sup>18</sup> Na taj način spriječila se i sama ATP-azna aktivnost proteina Hsp – DnaK. Hsp-proteini u stanici imaju funkciju šaperona, dakle, pomažu u smatanju određenih proteina. U slučaju apidecina, također se može vidjeti kako ih ljudi mogu slobodno uzimati, upravo s obzirom na tu njihovu specifičnost – neće se vezati za membrane ljudskih stanica i uništiti ih, već samo za bakterije koje posjeduju navedene proteine.

Sintetizirani su i neki derivati apidecina modifikacijom N- ili C-kraja pa je modifikacija N-kraja pokazala sjajne rezultate protiv Gram-pozitivnih bakterija *Bacillus subtilis* i *Mycobacterium vaccae*.<sup>3</sup> S druge strane, dodavanje NH<sub>2</sub>-skupine na C-kraj apidecina, pokazalo je sjajne rezultate protiv Gram-negativnih bakterija *Escherichia coli* i *Salmonella typhi*.<sup>3</sup> Neki derivati sintetizirani su i na način da su na N-kraj dodavani linkeri (peptidne poveznice), mali peptidi koje prepoznaje serinska proteaza tripsin. Linker je vezan na nosač, koji može recimo biti polietilenglikol (PEG), što se vidi i na slici 4. Serinske proteaze kataliziraju antibakterijsku reakciju takvih apidecina, omogućuju njihovo djelovanje jer se arginin iz linkera veže u aktivno mjesto proteaze (tripsina) i na taj način dolazi do cijepanja peptidne veze između arginina i susjedne aminokiseline u linkeru.



Slika 4. Modificirani derivati apidecina. Adaptirano prema Kang H.-K., Kim C., Ho Seo C. i Park Y. (2017.) The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs) : a patent review. Front. J. Microbiol. Vol. 55, No. 1, pp. 1–12. doi : 10.1007/s12275-017-6452-1.

#### 4.4. HP (2-20)

HP (2-20) je antimikrobni peptid od 19 aminokiselina koji ima strukturu amfipatske  $\alpha$ -zavojnice (AKKVFKRLEKLFSKIQNDK-NH<sub>2</sub>) te je izoliran sa N-kraja ribosomskog proteina L1 iz bakterije *Helicobacter pylori*.<sup>3</sup>

Postoje derivati peptida HP (2-20), a jedan od njih je HPA3NT3 (FKRLKKLFFKKIWNWK-NH<sub>2</sub>) koji, u usporedbi sa nemodificiranim HP (2-20) peptidom, ima bolju antimikrobnu djelotvornost i smanjenu mogućnost toksičnosti za stanice sisavaca.<sup>3</sup> Ova dva peptida koriste se za uklanjanje akni (*Propionibacterium acnes*). Za ovakvu vrstu infekcije koriste se i benzoil-peroksid te klindamicin, međutim, naši antimikrobni peptidi primjenjuju se u puno manjoj koncentraciji (MIC = 0,8 i 0,4  $\mu$ M), za razliku od benzoil-peroksida (MIC = 62,5  $\mu$ M).<sup>3</sup> Koncentracija primijenjenog peptida HPA3NT3 slična je koncentraciji klindamicina (MIC > 0,2  $\mu$ M) i HPA3NT3 posjeduje antimikrobnu aktivnost protiv bakterija *S. aureus* (MIC = 3,13–50  $\mu$ M) i *P. aeruginosa* (MIC = 1,7  $\mu$ M).<sup>3</sup> HP (2-20) veže se na negativno nabijenu bakterijsku membranu kao monomer, a HPA3NT3 veže se kao oligomer.<sup>3</sup> Osim što razara bakterijsku membranu, HPA3NT3 djeluje i kao protuupalni peptid u ljudskim keratinocitima (prevladavajućim stanicama u epidermi, vanjskom sloju kože). Upale mogu nastati djelovanjem bakterija *P. acnes*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, pri čemu onda HPA3NT3 inhibira ekspresiju proteina IL-8 i TLR2.<sup>3</sup> TLR2 je receptor kojeg prepoznaju bakterije i vežu se na njega, a IL-8 je kemokin kojeg izlučuje receptor uslijed infekcije.

## 4.5. Mikrocin S

Mikrocin S antimikrobni je peptid izoliran iz bakterije *Escherichia coli* G3/10. Općenito, mikrocin S su antimikrobni peptidi izolirani iz *E. coli*. Sintetiziraju se pod uvjetima razgradnje hranjivih tvari, a kodiraju se pomoću klastera gena koji su smješteni u plazmidima ili na kromosomima bakterije *E. coli*.<sup>3</sup>

Mikrocin S učinkovit je protiv raznih bakterijskih infekcija, želučano-crijevnih poremećaja, pa čak i protiv tumora, ali može djelovati i kao antioksidans.<sup>3</sup> Gledajući na bakterijske infekcije, mikrocin S letalan je za patogenu *E. coli*, prisutnu u epitelnim stanicama crijeva organizma domaćina. Istraživanjima u *in vitro* uvjetima pokazalo se da nije nužna izolacija mikrocin S iz *E. coli* G3/10, već da je dovoljan samo dodatak same *E. coli* G3/10 u uzorak epitelnih stanica crijeva, koje sadrže patogenu *E. coli*, da bi djelovanje mikrocin S bilo učinkovito.<sup>3</sup> Geni potrebni za sintezu mikrocin S umetnu se u plazmid patogene bakterije, nakon čega se mogu eksprimirati u toj bakteriji i inhibirati njezino djelovanje. Ekspresiju gena za mikrocin S potaknut će vezanje glukagona za adrenergički receptor, pri čemu će doći do sinteze cAMP-a koji će se vezati sa CRP-proteinom i na taj način potaknuti vezanje RNA-polimeraze na mRNA i omogućiti spomenutu ekspresiju gena.<sup>19</sup> Nastali mikrocin S inhibirat će ekspresiju određenih gena u patogenoj *E. coli* vezanjem na njezinu RNA-polimerazu. Terapeutski učinak mikrocin S očituje se u autolizi (samorazgrađivanju) *E. coli* G3/10.<sup>3</sup> Inače, *E. coli* G3/10 dio je komercijalno dostupnog probiotičkog lijeka pod nazivom Symbioflor 2 za kojeg je dokazano da je siguran za ljudski organizam.<sup>3</sup>



## 4.6. Neki *De – novo* sintetizirani antimikrobni peptidi

### 4.6.1. APKAMKLLKLLKLQKKGI peptid

U određenim istraživanjima cilj je bio sintetizirati određene antimikrobne peptide, poznajući strukturu i djelovanje određenih prirodnih antimikrobnih peptida, peptida izoliranih iz ljudskog ili nekog drugog organizma. Sintetizirani peptid koji sadrži aminokiselinski slijed APKAMKLLKLLKLQKKGI izrazito je stabilan u *in vivo* uvjetima.

Sintetizirani antimikrobni peptid aminokiselinskog slijeda APKAMKLLKLLKLQKKGI učinkovit je u procesu zarastanja rana i regeneracije stanica kože.<sup>3</sup> Navedeni peptid posjeduje strukturu  $\alpha$ -zavojnice i umjesto središnjeg motiva, kojeg čini aminokiselinski slijed KLLKLLK, kao središnji motiv može postojati i aminokiselinski slijed RLLRLLR, a na N-, odnosno C-kraju nalaze aminokiselinski slijedovi APKAM i LQKKGI.<sup>3</sup> Peptid je, također, stabilan i pri uvjetima visoke koncentracije soli.<sup>3</sup> Osim što pospješuje zarastanje rana i proliferaciju stanica kože, posjeduje i učinkovita antibakterijska svojstva.

#### 4.6.2. Peptidi STAMP

Peptidi STAMP antimikrobni su peptidi koji se vežu na određeno mjesto u bakteriji koju treba ukloniti i na taj način selektivno inhibiraju i ubijaju određenu bakteriju. Strukturu peptida STAMP čine peptid za ciljno prepoznavanje određene vrste u bakteriji koji je kovalentno vezan za linker i koji se nalazi na N-kraju, linker i dio koji odgovara antimikrobnom peptidu koji se nalazi na C-kraju, a isto je povezan sa linkerom.<sup>3</sup>

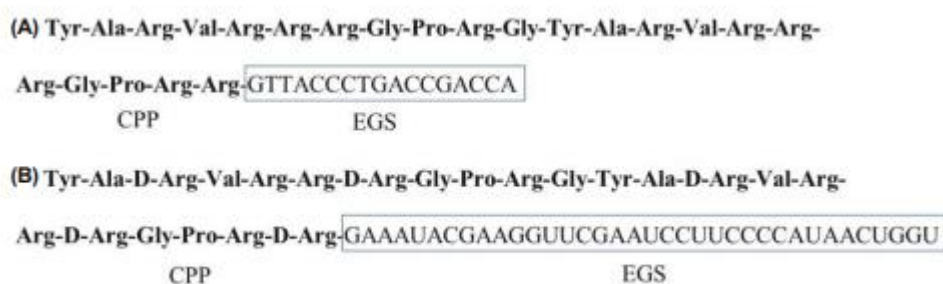
Peptid odgovaran za prepoznavanje može se sastojati od 5 do 30 aminokiselina i može recimo prepoznati proteine koji se vežu za LPS (proteine vezane na lipopolisaharide u membrani) u bakterijskoj stanici.<sup>3</sup> Linkeri (poveznice) su peptidi koji pospješuju aktivnost i stabilnost peptida zaslužnih za prepoznavanje i posjeduju manje od 20 aminokiselinskih ostataka. Sintetizirani su i peptidi u kojima su prisutne kombinacije peptida STAMP sa inhibitorima proteolitičkih enzima, poput etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) ili fenilmetansulfonil-fluorida (PMFS). Sintetizirane su i molekule koje uključuju peptide za prepoznavanje vezane na postojeće antibiotike, poput  $\beta$ -laktama, klindamicina, vankomicina i drugih. Peptidi STAMP pokazuju učinkovito djelovanje protiv bakterija *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* i *S. mutants*.<sup>3</sup> Peptid STAMP G10KHc strukturiran je pomoću Cat-1(KH), kao peptida za ciljno prepoznavanje, i od novispirina (G10), kao antimikrobnog peptida, koji su povezani preko linkera (slika 5.) i taj peptid pokazao je veliku antimikrobnu aktivnost protiv bakterije *P. aeruginosa*.<sup>3</sup> U usporedbi sa G10 peptidom (peptidom bez lizina i histidina na kraju koji povezuje peptid za ciljno prepoznavanje i linker), koncentracija peptida G10KHc, koja je potrebna za antimikrobno djelovanje, puno je manja (MIC = 0,5-29  $\mu$ M).<sup>3</sup> Antimikrobna aktivnost G10KHc slična je aktivnosti antibiotika tobramicina protiv rezistencije spomenute bakterije na antibiotike. Kako bi se G10KHc zaštitio od proteolitičkih enzima (serinskih proteaza), na peptid je dodana D-aminokiselina (G10KHc-D).<sup>3</sup>



#### 4.6.3. CPP – EGS peptidi

Peptidi CPP-EGS su peptidi koji se sastoje od peptida CPP koji je zaslužan za antimikrobno djelovanje, a kako bi povećao svoje antimikrobno djelovanje, CPP može biti konjugiran sa određenim oligonukleotidom – riječ je o njegovoj kombinaciji sa modificiranom RNA ili DNA, kao što je na primjer EGS, sekvenca koja je takozvani vanjski vodič – sekvenca za prepoznavanje (slika 6.).<sup>3</sup>

Peptid CPP djeluje tako da se translocira u bakterijsku stanicu i veže na određenu molekulu nakon što razori bakterijsku membranu. Aminokiselinski slijed EGS reducira ekspresiju nekih važnijih bakterijskih gena i gena koji su zaslužni za rezistentnost bakterija na antibiotike.<sup>3</sup> EGS oligonukletidi molekule su čije se djelovanje zasniva na njihovom vezanju na ciljnu molekulu RNA pri čemu nastaje određena struktura koja dovodi do aktivacije ribonukleaze P, enzima za razgradnju RNA.<sup>3</sup> EGS oligonukletidi vrlo su učinkoviti s obzirom na to da se ribonukleaze P iz bakterije i iz eukariotskih stanica bitno razlikuju. Prema tome, peptidi CPP-EGS neće biti štetni za RNA eukariotskih stanica. Proučavani su peptidi CPP-EGS vezani na *gyrA* gene (peptidi AB2gyr313) i oni imaju snažno antimikrobno djelovanje protiv bakterija *E. coli* i *S. aureus*.<sup>3</sup> Također, sekvenca EGS veže se i na sekvencu *gyrA* gena u *Plasmodium falciparum* na način da inhibira njezin rast tijekom samog njezinog razvijanja u domaćinu. EGS sekvenca može spriječiti i ekspresiju *cat* i *bla* gena koji su zaslužni za rezistentnost bakterija na antibiotike (*cat* gen zaslužan je za rezistentnost na kloramfenikol, a *bla* za rezistentnost na penicilin).<sup>3</sup>



Slika 6. Primjeri CPP – EGS konjugata. Adaptirano prema Kang H.-K., Kim C., Ho Seo C. i Park Y. (2017.) The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs) : a patent review. Front. J. Microbiol. Vol. 55, No. 1, pp. 1–12. doi : 10.1007/s12275-017-6452-1.

## § 5. PRIJENOS ANTIMIKROBNIH PEPTIDA U ORGANIZMU

Antimikrobni peptidi ne mogu se prenositi kroz organizam bez određenih transportera koji omogućuju njihovo uspješno dostavljanje u ciljne stanice. Kada bi peptidi putovali organizmom bez određenog transportera, došlo bi do njihove razgradnje od strane proteolitičkih enzima koji se nalaze u želučano-crijevnom sustavu i krvotoku te do oštećenja zdravih stanica.

Glavni načini uzimanja određenog lijeka koji sadrži antimikrobne peptide su uzimanje pilula, potkožna injekcija i injekcija koja ide direktno u venu.<sup>4</sup> Navedeni načini uzrokuju trenutno otpuštanje lijeka tamo gdje je to potrebno i koncentracija određenog lijeka mora biti prilično visoka kako bi se s vremenom mogla uspješno smanjiti određena infekcija. Postoji kontinuirani način otpuštanja antimikrobnog lijeka i on je dosta značajan jer je njegovo djelovanje predvidljivo i produljeno te smanjuje mogućnost predoziranja.<sup>4</sup> Već je ranije spomenuto kako antimikrobni lijekovi djeluju i na određenom mjestu u stanici kako bi se spriječilo njihovo toksično djelovanje. Antimikrobni peptidi transportiraju se u organizmu pomoću nano-čestica koje na kraju moraju i izaći iz organizma i u koje ne smije ući nijedna druga molekula, a radi se o nano-sustavima koji mogu postojati kao anorganski sustavi, liposomi, polimerne molekule ili ugljične nano-tubule.<sup>4</sup> Prednost takvih sustava je u njihovoj samo-sintezi i veličini (nekoliko stotina nanometara), što im omogućuje svladavanje bioloških barijera, poput bakterijske membrane, i interakciju sa unutarstaničnim odjeljcima.<sup>4</sup> Nano-sustavi imaju mogućnost dostavljanja veće količine antimikrobnih lijekova u određenu stanicu i mogućnost njihovog otpuštanja u stanicu u kontroliranim uvjetima. Nano-čestice mogu jako varirati u veličini što onda utječe na njihovu bioraspodjelivost i na vrijeme koje je potrebno da putuju krvlju do određenog mjesta.<sup>4</sup> Čestice koje su manje od 10 nm bivaju izbačene iz organizma prodiranjem u neka tkiva ili kroz tjelesne šupljine, one koje posjeduju veličinu od 10 do 70 nm mogu proći i kroz vrlo uske kapilare, onima sa veličinom od 70 do 200 nm treba najviše vremena da dođu do ciljne stanice, a one koje su veće od 200 nm bivaju uhvaćene u slezeni i pojedene od strane fagocita.<sup>4</sup> Površina nano-čestica može biti modificirana pomoću određenih molekula kako bi što specifičnije i efikasnije reagirale sa ciljnom stanicom te kako bi ostale što duže u krvi i produžile svoje vrijeme poluživota.

## 5.1. Neki tipovi nano – čestica

### 5.1.1. Liposomi

Liposomi su prve predložene nano-čestice promjera nekoliko stotina nanometara i riječ je o umjetno pripremljenim sfernim česticama koje su omeđene lipidnim dvoslojem.<sup>4</sup> Lipidni dvosloj čine fosfolipidi i kolesterol koji regulira fluidnost membrane, a površina može biti neutralna ili nabijena.

Gledajući njihovu mogućnost prijenosa antimikrobnih peptida, promjer im varira od 50 do 200 nm. Liposomi kao mikro-rezervoari jako dobro funkcioniraju i dostavljaju antimikrobne peptide na ciljna mjesta zbog toga što štite sami peptid od degradacije, sprječavaju nuspojave i reduciraju njihovu toksičnost za zdrave stanice.<sup>4</sup> Stabilnost liposoma osigurava fosfolipidni dvosloj, točnije, ugljikovodični lanci fosfolipida. Neutralni liposomi sa gusto pakiranim membranama omogućuju dulje zadržavanje i vrijeme poluživota određenog antimikrobnog peptida u *in vivo* uvjetima.<sup>4</sup> Takve kompaktne, gusto pakirane membrane onemogućuju vezanje proteina na membranu koji bi inicirali degradaciju samih liposoma, onemogućuju da liposom bude pojeđen od strane fagosoma. Uobičajeno vrijeme poluživota liposoma je 12 sati, ali to će ovisiti o dozi antimikrobnog peptida koju je liposom primio.<sup>4</sup> Liposomi koji u svojoj membrani sadrže polietilen-glikol (PEG) posjeduju vrijeme poluživota iznad 12 sati pa je polietilen-glikol molekula koja je zaslužna za izrazito stabilnu strukturu liposoma. Liposomi se prirodno uklanjaju iz krvi pomoću makrofaga, uglavnom u jetri i slezeni.<sup>4</sup> Otpuštanje antimikrobnih peptida iz liposoma može biti pasivno i aktivno. Aktivno otpuštanje, za razliku od pasivnog, uzrokuje destabilizaciju liposomske membrane.<sup>4</sup> Do takve destabilizacije može doći zbog uvjeta prisutnih u određenom patogenu, kao što su: niska pH-vrijednost ili prisutnost određenih enzima. Mnogi antibiotici inaktivni su protiv Gram-negativnih bakterija jer nemaju mogućnost razaranja njihove membrane. Liposomi mogu biti nositelji određenih antibiotika, na primjer vankomicina, i na taj način ih transportirati na mjesto gdje je potrebno jer mogu fuzionirati sa bakterijskom membranom i na taj način inhibirati njezino djelovanje. Polimiksin B ili tobramicin kao antibiotici u liposomu učinkoviti su protiv uzročnika cistične fibroze *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>4</sup>

### 5.1.2. Polimerne strukture

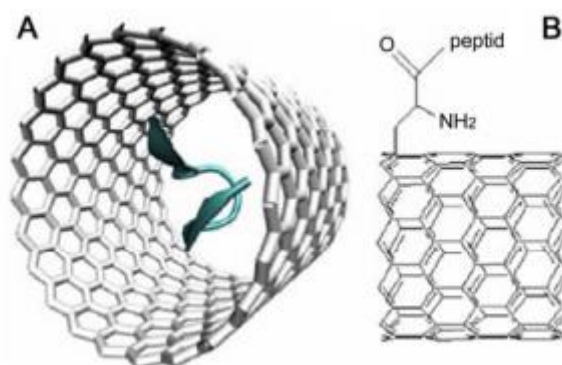
Polimerne nano-strukture također su jako dobri transporteri antimikrobnih peptida na specifična mjesta u stanici ili tkivu. Mogu ih činiti prirodni ili nosintetizirani polimeri, a veličina im se kreće od 10 do 1000 nm. I kod ovakvih struktura ponekad je potrebna modifikacija površine kako bi se što bolje svladala barijera između transportera i ciljne stanice i kako bi se omogućilo otpuštanje antimikrobnog peptida u samu stanicu.

Postoje tri načina na koja se antimikrobni peptid može ubaciti u ovakvu nano-česticu : ubacivanje peptida istovremeno sa formiranjem čestice, dodavanje već formiranih čestica u otopinu peptida i ubacivanje konjugiranih peptida u preoblikovanu česticu.<sup>4</sup> Otpuštanje antimikrobnog lijeka odnosi se na difuziju antimikrobnih peptida kroz polimernu barijeru nano-čestice ili na otpuštanje adsorbiranih peptida s njezine površine.<sup>4</sup> Površinu ovakvih nano-struktura čine hidrofilni polimeri koji djeluju kao površinski aktivne tvari i biorazgradivi polimeri koji imaju neke hidrofilne skupine. Neki polimeri koji prekrivaju površinu polimernih nano-struktura su polietilen-glikol (PEG), polietilenoksid, poloksamer, polisorbit (Tween-80) i laurilni eteri.<sup>4</sup> Svojstva polimernih nano-struktura ovisit će o samom polimernom sastavu – polikationi su citotoksični i hemolitični, dok su polianioni manje citotoksični, ali mogu uzorokovati antikoagulaciju i otpuštanje citokina.<sup>4</sup> Neki od tipova polimernih nano-struktura su hidrogelovi koji se sastoje od umreženih nabijenih ili neutralnih polimera i njihova zajednička karakteristika je sposobnost bubrenja upijanjem velike količine vode te mogu varirati u svojim svojstvima promjenom uvjeta, na primjer promjenom pH-vrijednosti, ionske jakosti ili temperature.<sup>4</sup> U slučaju hidrogelova, antimikrobni peptid otpušta se u ciljnu stanicu tijekom bubrenja samoga gela. Prednosti polimernih nano-struktura su: velika stabilnost, sposobnost da pri dodiru sa živom stanicom ne izazovu njezino oštećenje ili alergijske reakcije organizma, veliki omjer površine i volumena, sposobnost regulacije degradacije polimera i otpuštanja peptida i povećavanje vremena poluživota peptida. Najznačajniji sintetički polimeri koji se koriste su polihidroksikiseline, polikaprolaktini, polieter-esteri, poliortoesteri, polianhidridi, polifosfateni i poliaminokiseline.<sup>4</sup> Otpuštanje antimikrobnih peptida ovisit će o kinetici biorazgradivosti polimera, fizikalno-kemijskim svojstvima polimera i samih peptida te o termodinamičkoj kompatibilnosti između peptida i polimernih struktura.<sup>4</sup>

### 5.1.3. Ugljikove nano-tubule

Ugljikove nano-tubule su cilindri čija je membrana izgrađena od grafena pa odatle i naziv „ugljikove“. Radi se o cilindrima promjera od 10 do 100 nm i duljine nekoliko stotina nm.<sup>4</sup> Iako nisu topljivi u fiziološkim uvjetima, za ovakve nano-cilindre uvele su se razne modifikacije koje povećavaju njihovu topljivost u vodenim medijima i na taj način omogućuju prijenos antimikrobnih peptida organizmom.

Ugljikove nano-tubule mogu biti modificirane bioaktivnim peptidima, proteinima, nukleinskim kiselinama i nekim lijekovima (slika 7.).<sup>4</sup> Uvođenjem modifikacija ugljikove nano-tubule su topljivije u fiziološkim uvjetima, ali i dalje ostaju bionerazgradive. Ovakve nano-tubule vrlo uspješno prenose antimikrobne peptide zbog toga što nisu toksične za zdrave stanice i omogućuju odgovor organizma, specifičnu imunoreakciju, kada se unesu u organizam. Također, imaju i izrazito veliku sposobnost svladavanja ciljne membrane, odnosno stanice. Peptidi, prije nego što uđu u nano-tubulu, prvo interagiraju sa vanjskim dijelom membrane cilindra, zatim ulaze unutra i vežu se kovalentnim interakcijama za sam cilindar pri čemu dolazi do promjene u konformaciji peptida. Na taj način peptidi su dodatno stabilizirani. Ukoliko peptidi interagiraju nekovalentnim interakcijama sa vanjskim dijelom nano-tubula, neće doći do značajnije promjene njihove konformacije.<sup>4</sup>



Slika 7. Shematski prikaz peptida u obliku beta-ukosnice unutar ugljikove nano-tubule (A) i peptida koji je kovalentno vezan za vanjski dio ugljikove nano-tubule (B). Adaptirano prema Urbán P., Valle-Delgado J. J., Moles E., Marques J., Díez C. i Fernández-Busquets X. (2012.) Nanotools for the Delivery of Antimicrobial Peptides. *Front. Curr Drug Targets*, Vol. 13, No. 9, 1158 – 1172, doi : 1873-5592/12 \$58.00+.00



## 5.2. Molekule koje omogućuju uspješan prijenos antimikrobnih peptida

Kako bi se nano-čestica zajedno sa antimikrobnim peptidom uspješno prenijela do ciljne molekule, potrebne su molekule koje će omogućiti uspješan prijenos tih čestica do određenih molekula, njihovo uspješno vezanje i ubacivanje samog antimikrobnog peptida u bakteriju. Molekule koje to omogućuju su antitijela, ugljikohidrati, određeni peptidi i DNA aptameri.

Prijenos antimikrobnih peptida preko bioloških membrana jako će ovisiti o svojstvima transportera (naboj, veličina, hidrofobnost, fleksibilnost, oblik), ali i o svojstvima same biološke membrane, kao što su lokacija, funkcija i propusnost.<sup>4</sup> Kako bi nano-čestica sa peptidom mogla uopće interagirati sa ciljnom bakterijskom stanicom, potrebni su joj određeni ligandi, molekule koje će selektivno interagirati sa receptorima na biološkim membranama. Takve molekule mogu se vezati na nano-česticu elektrostatskim interakcijama, kovalentnim interakcijama, njihovo vezanje može biti specifično, a mogu se i adsorbirati na površinu čestice. Biološke molekule koje mogu poslužiti kao spomenuti ligandi su proteini, nukleinske kiseline i polisaharidi. Neki od njih bit će spomenuti u daljnjem tekstu.

### 5.2.1. Antitijela

Antitijela su proteini koji sa visokom specifičnošću mogu prepoznati antigen i zbog toga omogućuju i sam prijenos antimikrobnog peptida do ciljne molekule. Sintetizirana su monoklonska antitijela, prema ljudskim antitijelima. Proučavani su određeni fragmenti proizvedenog antitijela koji su bitni za prijenos nano-čestice sa antimikrobnim peptidom.

Što se tiče kovalentnog povezivanja antitijela sa nano-česticom, ono uključuje interakciju tiolne skupine iz zglobne regije antitijela sa fosfolipidnim dvoslojem nano-čestice. Takva antitijela nazivaju se polu-antitijela i sastoje se od dva „teška“ lanca i dva „laka“ lanca, pri čemu su „teški“ lanci povezani disulfidnim mostom, a njihovom redukcijom nastaju slobodne tiolne skupine koje se nalaze na zglobovima „teških“ lanaca. Ovakva kovalentna interakcija može uzrokovati negativnu modifikaciju amino-skupina koje se nalaze na mjestu vezanja antigena. Postoje određeni problemi u korištenju antitijela pri prijenosu antimikrobnih peptida, a mogu se odnositi na poticanje otpuštanja citokina što pokreće cijelu kaskadu nekontroliranih imunoloških reakcija.<sup>4</sup>

### 5.2.2. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su također jedni od jako dobrih posrednika u prijenosu nano-čestice sa antimikrobnim peptidom do odredišta. Poznati su po tome što mogu činiti klastere i kao takvi se vezati na površinu nano-čestice, čime se uspostavljaju puno jače interakcije, nego njihovim individualnim vezanjem. Proučavane su i interakcije glikokonjugata sa nano-sustavima.

S obzirom na to da ugljikohidrati čine klastere, imaju mogućnost stvarati vrlo kompaktnu i stabilnu strukturu sa nano-sustavima. Dakle, ugljikohidrati imaju sposobnost stvaranja polivalentnih kompleksa, čime se pojačavaju sile koje osiguravaju asocijaciju ugljikohidrata.<sup>20</sup> Varijabilnost u njihovoj strukturi također doprinosi njihovoj sposobnosti pohranjivanja biološke informacije. Zahvaljujući varijabilnosti u anomernim strukturama, poziciji veza, veličini prstena, grananju i dodavanju specifičnih supstituenata, određeni oligosaharidi posjeduju veliku gustoću.<sup>4</sup> Istraživanja su pokazala da će glikozilirane razgranate molekule jako dobro interagirati s prirodnim receptorima za ugljikohidrate. Razgranati poliamidoamini mogu biti modificirani s peptidima i s ugljikohidratima pri čemu galaktoza obavlja poli-L-lizin što sprječava njihovo uklanjanje makrofagom, a sprječava i njihovu hemolitičku aktivnost, kao i izazivanje specifične imunoreakcije unosom antigena.

## § 6. ZAKLJUČAK

Antimikrobni peptidi kationske su molekule od 10 do 50 aminokiselina koje postoje u organizmima, a mogu se dobiti i u laboratoriju. U laboratoriju se uglavnom sintetiziraju na temelju nekog prirodnog antimikrobnog peptida, a mogu se dobiti i modificiranjem već postojećih antibiotika. Struktura im se može opisati pomoću  $\alpha$ -zavojnica,  $\beta$ -ploča ili njihovom kombinacijom. Njihovo djelovanje vrlo je rasprostranjeno – već se u njihovom nazivu vidi da se radi o spojevima koji će inhibirati bakterijsko djelovanje, a mogu djelovati i na način da sudjeluju u reakcijama koje se javljaju kao odgovor imuniteta određenog organizma na infekciju. U ovom radu fokus je uglavnom bio na antibakterijskom djelovanju antimikrobnih peptida. Antimikrobni peptidi mogu djelovati tako da razore bakterijsku membranu s kojom dođu u kontakt i na taj način uđu u samu bakteriju. Drugi način je onaj manje invanzivan, a podrazumijeva samo prolazak peptida kroz bakterijsku membranu i ulazak u stanicu. Kako bi se uopće utjecalo na vijabilnost bakterije, ulaskom antimikrobnih peptida u bakteriju dolazi do vezanja peptida na određene molekule koje se nalaze u bakteriji, npr. molekule RNA ili proteine. S obzirom da su antimikrobni peptidi podložni djelovanju raznih proteolitičkih enzima koji postoje u određenom organizmu, oni se kroz organizam prenose pomoću nano-čestica, kao što su liposomi, polimerne strukture ili ugljikove nano-tubule. Međutim, i za sam prijenos antimikrobnih peptida pomoću nano-čestica potrebne su neke dodatne molekule koje će omogućiti uspješnu dostavu tog peptida u ciljnu stanicu. Molekule koje to omogućuju su antitijela, ugljikohidrati, DNA aptameri i određeni peptidi. Antimikrobni peptidi u organizam se mogu unijeti na više načina: oralno, injekcijom ili nekim drugim putem. Djelovanje određenih antimikrobnih peptida nije još do kraja razjašnjeno, ali se radi na tome da mnoga istraživanja antimikrobnih peptida budu prihvaćena jer takve molekule predstavljaju jako dobro rješenje za mnoge infekcije, s obzirom da su mnoge bakterije danas otporne na postojeće antibiotike. Treba uzeti u obzir i da antimikrobni peptidi, koji su spomenuti u ovom radu, nisu štetni za zdrave stanice u organizmu, što znači da su specifični za pojedinu bakteriju.

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. Y. J. Gordon, E. G. Romanowski, *Curr Eye Res.* **30** (2005) 505–515.
2. M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, C. Björn, *Cell. Infect. Microbiol.* **6** (2016) 1 – 12
3. H.-K. Kang, C. Kim, C. Ho Seo, Y. Park, *J. Microbiol.* **55** (2017) 1 – 12
4. P. Urbán, J. J. Valle-Delgado, E. Moles, J. Marques, C. Díez, X. Fernández-Busquets, *Curr Drug Targets.* **13** (2012) 1158 – 1172
5. V. Nizet, T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rudisill, R. A. Dorschner, *Nature* **414** (2001) 454–457
6. R. J. Dubos, *J. Exp. Med.* **70** (1939) 1–10.
7. R. E. Hancock, D. S. Chapple, *Antimicrob. Agents Chemother.* **43** (1999) 1317–1323.
8. Y. Lai, R. L. Gallo, *Trends Immunol.* **30** (2009) 131–141
9. H. N. Hunter, A. R. Demcoe, H. Jenssen, T. J. Gutteberg, H. J. Vogel, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (2005) 3387–3395
10. D. Legrand, E. Ellass, M. Carpentier, J. Mazurier, *Cell. Mol. Life Sci.* **62** (2005) 2549–2559
11. M. Pasupuleti, A. Schmidtchen, M. Malmsten, *Crit. Rev. Biotechnol.* **32** (2012) 143–171
12. M. R. Yeaman, N. Y. Yount, *Pharmacol. Rev.* **55** (2003) 27–55
13. D. Takahashi, S. K. Shukla, O. Prakash, G. Zhang, *Biochimie* **92** (2010) 1236–1241
14. L. T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel, *Trends Biotechnol.* **29** (2011) 464–472
15. M. Zasloff, *Nature* **415** (2002) 389–395
16. K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (2009) 1687–1692
17. T. Ebenhan, O. Gheysens, H. G. Kruger, J. R. Zeevaart, M. M. Sathekge, *BioMed Res. Int.* (2014)
18. W.F. Li, G.X. Ma, X.X. Zhou, *Peptides* **27** (2006) 2350–2359.
19. M.J. Chiuchiolo, M.A. Delgado, R.N. Farias, R.A. Salomon, *J. Bacteriol.* **183** (2001) 1755–1764
20. I. Bucior, M.M. Burger, X. Fernández-Busquets, *The Sugar Code* (2009) 347- 62.