



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Helena Križan

Antimikrobni peptidi – dizajn i primjena u biomedicini

KEMIJSKI SEMINAR I

Temeljen na C. Zhong, Y. He, J. Zou, et al. An antimicrobial peptide as a potential therapy for bacterial pneumonia that alleviates antimicrobial resistance.

Nature Communications **2025** 16:1 2025, 16 (1), 10488-.

Mentor:

Prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2026. godina

Sadržaj

SAŽETAK.....	III
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Borba protiv bakterija.....	1
1.2. Vrste antibiotika i njihov mehanizam djelovanja	1
1.3. Antibiotička rezistencija	2
1.4. Antimikrobni peptidi	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Klasifikacija antimikrobnih peptida	3
2.2. Mehanizam djelovanja	4
2.3. Klinička primjena	5
2.4. Farmakološki izazovi i strategije dizajna boljih AMP-ova	5
§ 3. NOVI ANTIMIKROBNI PEPTID KAO POTENCIJALNA TERAPIJA	6
3.1. Dizajn i karakterizacija AMP 1003	6
3.2. Antimikrobna aktivnost, selektivnost i stabilnost AMP 1003	6
3.3. AMP 1003 smanjuje razvoj antimikrobne rezistencije	8
3.4. Višestruki mehanizmi djelovanja AMP 1003	9
3.5. Analiza transkriptoma.....	10
3.6. Terapijska učinkovitost u mišjim modelima upale pluća i protuupalna aktivnost.....	11
3.7. Sigurnosni profil <i>in vivo</i>	11
§ 4. ZAKLJUČAK	13
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	XIV



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Kemijski seminar I

SAŽETAK

ANTIMIKROBNI PEPTIDI – DIZAJN I PRIMJENA U BIOMEDICINI

Helena Križan

Antimikrobni peptidi su kratke molekule urođenog imuniteta s širokim spektrom djelovanja protiv bakterija, gljiva i virusa. Zbog rastućeg problema antibiotske rezistencije, istražuju se kao alternativa konvencionalnim antibioticima.

Ovaj seminar opisuje dizajn, mehanizam djelovanja i terapijski potencijal peptida AMP 1003, sastavljenog od četiri ponavljajuće jedinice D-triptofana, D-arginina i D-lizina. Zamjena L-aminokiselina D-enantiomerima značajno je povećala proteolitičku stabilnost uz zadržavanje širokog antimikrobnog spektra, uključujući aktivnost protiv multirezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* i *Klebsiella pneumoniae*. AMP 1003 ima višestruko djelovanje, narušava integritet bakterijske membrane, veže DNA, inducira oksidativni stres i remeti energetske metabolizam, čime otežava razvoj rezistencije. U mišjim modelima upale pluća pokazao je terapijsku učinkovitost usporedivu s vankomicinom i polimiksinom B uz znatno bolji sigurnosni profil. Dodatno protuupalno djelovanje čini ga obećavajućim kandidatom za liječenje bakterijskih infekcija uzrokovanih rezistentnim patogenima.

§ 1. UVOD

1.1. Borba protiv bakterija

Iako je većina bakterija bezopasna ili čak korisna za ljudsko zdravlje, manji dio čine patogene vrste sposobne uzrokovati blage do teške infekcije.¹ Te bakterije razvile su različite mehanizme kojima nadvladavaju obrambene sustave domaćina, izbjegavaju imunološki nadzor i uzrokuju bolest. Imunološki sustav djeluje kroz urođeni i adaptivni imunitet, ali bakterijske infekcije i dalje predstavljaju velik zdravstveni problem.^{1,2} Prijenos patogena može se odvijati izravnim kontaktom, zrakom, vodom, hranom ili putem vektora. Stoga su od velike važnosti preventivne mjere poput higijene, kontrole infekcija, obrade vode, cijepljenja i dostupnost učinkovitih lijekova, uključujući antibiotike, koji su ključni za suzbijanje bakterijskih bolesti.¹

1.2. Vrste antibiotika i njihov mehanizam djelovanja

Antibiotici se klasificiraju prema mehanizmu djelovanja i kemijskoj strukturi. Uglavnom djeluju na sintezu stanične stijenke, biosintezu proteina, sintezu nukleinskih kiselina i metaboličke puteve sinteze folne kiseline, pri čemu ciljaju procese specifične ili znatno različite u bakterijama u odnosu na stanice domaćina.³⁻⁵

Među najvažnijim skupinama su β -laktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami), koji inhibiraju umrežavanje peptidoglikana vezanjem za penicilin-vezujuće proteine, te glikopeptidi, koji sprječavaju ugradnju prekursora peptidoglikana u stijenku.^{3,4} Aminoglikozidi i tetraciklini na vežu se na 30S podjedinicu ribosoma,^{3,5} a makrolidi, kloramfenikol i oksazolidinoni na 50S podjedinicu blokirajući translaciju.⁵ Antibiotici koji djeluju na nukleinske kiseline uključuju kinolone i fluorokinolone, koji inhibiraju DNA girazu i topoisomerazu IV, te rifamicine koji blokiraju RNA-polimerazu.⁵ Antimetaboliti poput sulfonamida i trimetoprima inhibiraju enzime u biosintezi folne kiseline, te time inhibiraju sintezu purina i pirimidina.³

1.3. Antibiotička rezistencija

Pretjerana i nepravilna uporaba antibiotika, u medicini, veterini i stočarstvu, ubrzava selekciju rezistentnih sojeva.⁶ Čak i niske koncentracije antibiotika mogu dovesti do preživljavanja visoko rezistentnih i hipermutabilnih populacija bakterija te olakšati prijenos gena rezistencije.⁵ Poseban problem predstavljaju multirezistentni patogeni, tzv. „superbakterije”, poput MRSA, VRE i karbapenem-rezistentnih gram-negativnih bakterija.⁷

Bakterije mogu biti intrinzično, adaptivno ili stečeno rezistentne. Intrinzična rezistencija proizlazi iz prirodnih obilježja vrste, adaptivna je prolazna reakcija na stresne uvjete, dok stečena nastaje mutacijama ili horizontalnim prijenosom gena. Glavni mehanizmi uključuju smanjen ulazak antibiotika, promjenu ciljnog mjesta, enzimsku inaktivaciju i aktivno izbacivanje lijeka, često u kombinaciji, što smanjuje učinkovitost terapije.^{5,8,9}

Suočavanje s antimikrobnom rezistencijom zahtijeva racionalnu primjenu antibiotika, razvoj novih lijekova, bolje higijenske i epidemiološke mjere te cjepiva.⁵ U tom kontekstu istražuju se i alternativne terapije, poput antimikrobnih peptida, koji pokazuju potencijal kao dopuna ili zamjena konvencionalnih antibioticima.⁷

1.4. Antimikrobni peptidi

Antimikrobni peptidi (AMPs, peptidi obrane domaćina) kratke su molekule prisutne u gotovo svim oblicima života i predstavljaju evolucijski očuvan mehanizam urođene imunosti. Većina AMP-ova ima 10–50 aminokiselina, pretežno su pozitivno nabijeni te imaju i hidrofobne i hidrofilne dijelove, što im omogućuje interakciju s bakterijskim membranama i destabilizaciju stanica.^{6,7,9} Osim klasičnog membranskog djelovanja, mogu djelovati i unutar stanice, često djelujući na više molekularnih meta istodobno, čime se smanjuje rizik od razvoja rezistencije.^{2,6,7,10}

AMP-ovi pokazuju širok spektar djelovanja protiv bakterija, gljiva, virusa i parazita^{5,9,10} te imaju imunomodulatorna svojstva.¹⁰ Zbog aktivnosti protiv multirezistentnih sojeva, uključujući *Staphylococcus aureus* rezistentnu na meticilin (MRSA) i druge „superbakterije”, AMP-ovi se smatraju obećavajućom alternativom ili dopunom klasičnim antibioticima.⁷ Iako je njihov terapijski potencijal visok, izazovi poput stabilnosti, toksičnosti i troškova proizvodnje još ograničavaju širu kliničku primjenu.¹⁰

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Klasifikacija antimikrobnih peptida

Antimikrobni peptidi (AMP-ovi) predstavljaju izuzetno raznoliku skupinu molekula, pa se njihova klasifikacija može napraviti prema nekoliko kriterija: prema strukturnim obilježjima i biološkom podrijetlu, ali i prema biološkoj aktivnosti ili zastupljenijim aminokiselinama.⁶

2.1.1. Podjela AMP-ova prema strukturi

Na temelju sekundarne strukture, AMP-ovi se dijele u četiri glavne skupine. Linearni α -helikalni peptidi (<40 aminokiselina) u kontaktu s membranama poprimaju amfipatičnu konformaciju i destabiliziraju bakterijsku stijenku. β -pločasti peptidi s β -nitima stabiliziranim disulfidnim vezama učinkovito se vežu za membranu i otporni su na proteolizu. Linearni prošireni peptidi bez definirane sekundarne strukture djeluju i na membranu i unutarstanične ciljeve, dok mješoviti α/β i ciklički peptidi kombiniraju fleksibilnost i stabilnost, često dodatno ojačani kovalentnim vezama, što povećava njihovu otpornost i funkcionalnu raznolikost.⁶

2.1.2. Podjela AMP-ova prema podrijetlu

AMP-ovi se proizvode u gotovo svim domenama života, što odražava njihovu ključnu ulogu u obrani domaćina. Sisavci proizvode katelicidine i defenzine, koji osim antimikrobnog djelovanja reguliraju imunitet i potiču cijeljenje rana. Vodozemci luče AMP-ove u kožnim sekretima, poput magainina iz roda *Xenopus*, dok insekti sintetiziraju peptide u masnom tijelu i hemocitima, primjerice cekropine. Mikrobni AMP-ovi uključuju bakteriocine i polimiksine, a biljni i morski organizmi proizvode AMP-ove poput tionina, snakina, aurelina i mitilina, koji pomažu u obrani protiv mikroorganizama.^{6,7}

2.1.3. Podjela AMP-ova prema aktivnosti i više zastupljenim aminokiselinama

AMP-ovi se mogu klasificirati i prema biološkoj aktivnosti. Najveću skupinu čine antibakterijski peptidi (~60%), zatim antifungalni (~26%), dok antivirusni, antiparazitski, antikancerogeni i anti-HIV peptidi čine po 2–5%.⁶

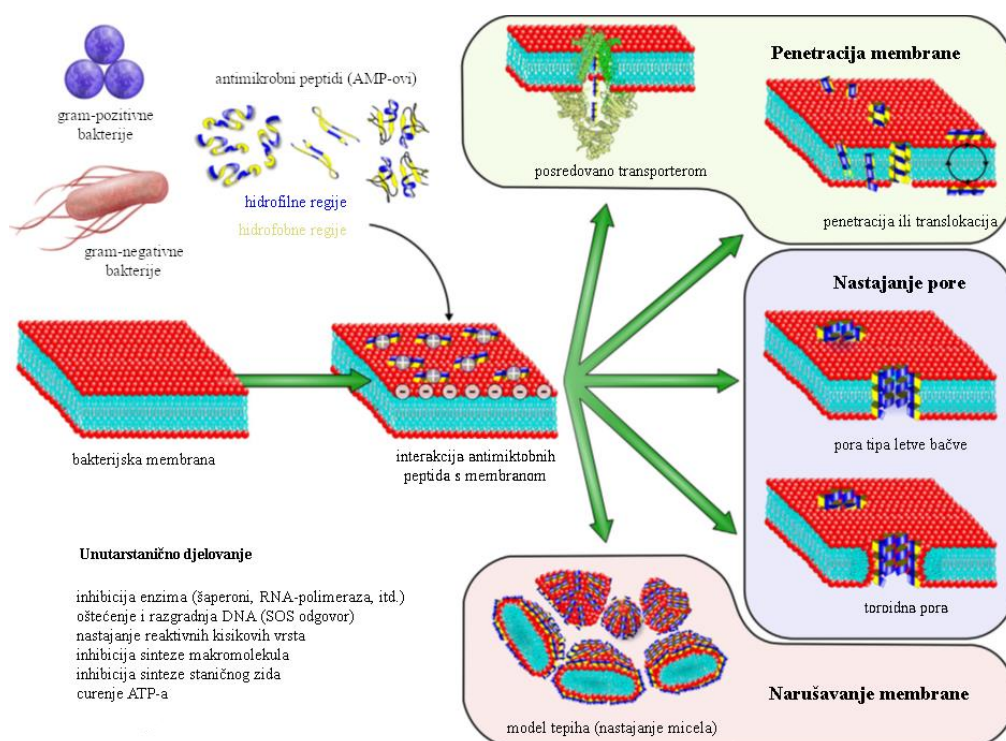
Također, AMP-ovi se mogu podijeliti prema zastupljenim aminokiselinskim vrstama na: peptide bogate prolinom, bogate triptofanom i argininom, bogate histidinom i bogate glicinom.

6

2.2. Mehanizam djelovanja

2.2.1. Djelovanje na membrane

Primarni mehanizam djelovanja AMP-ova jest narušavanje integriteta bakterijske membrane, što proizlazi iz njihove selektivne interakcije s negativno nabijenim mikrobnim membranama, ^{6,7,10} za razliku od neutralnijih membrana stanica domaćina. Elektrostatska privlačnost omogućuje vezanje i umetanje peptida u lipidni dvosloj, što dovodi do destabilizacije i permeabilizacije membrane uz minimalnu citotoksičnost. Oštećenje membrane opisuje se modelima poput letve bačve (engl. *barrel-stave*), toroidne pore, tepiha i agregatnog modela, koji se razlikuju u načinu stvaranja pora i destabilizacije dvosloja (slika 1).^{6,8,9}



Slika 1. Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida može uključivati: djelovanje na membrane kroz nekoliko modela (npr. model bačvaste letve, toroidne pore ili tepiha) te djelovanje unutar stanice. Slika prilagođena prema izvoru.⁷

2.2.2. Djelovanje unutar stanice

Iako je narušavanje membrane glavni mehanizam djelovanja AMP-ova, neki peptidi djeluju i pri nižim koncentracijama bez lize stanice, što upućuje na djelovanje unutar stanice. Takvi nelitički AMP-ovi mogu prodrijeti u citoplazmu, utjecati na replikaciju DNA, transkripciju i translaciju, na rad šaperona i proteaza te druge ključne metaboličke procese.^{6,8,9}

Zbog sposobnosti istodobnog djelovanja na više staničnih meta, AMP-ovi pokazuju snažnu antimikrobnu aktivnost uz manju vjerojatnost razvoja rezistencije u usporedbi s klasičnim antibioticima.¹¹

2.3. Klinička primjena

Antimikrobni peptidi predstavljaju obećavajuće terapijske kandidate kao izravni antimikrobni agensi ili predlošci za razvoj peptidomimetika,⁶ osobito zbog djelovanja na multirezistentne bakterije i mogućnost sinergije s postojećim antibioticima.^{9,10} Neki AMP-ovi već imaju kliničku primjenu: polimiksini (npr. kolistin) koriste se kao terapija posljednje linije protiv multirezistentnih gram-negativnih bakterija, daptomicin se primjenjuje sustavno u liječenju teških infekcija, a gramicidin lokalno za površinske infekcije.^{2,9}

Osim antibakterijskog djelovanja, AMP-ovi pokazuju antivirusne, imunomodulatorne i potencijalno antitumorske učinke te nalaze primjenu u liječenju rana, dermatologiji, respiratornim i kirurškim infekcijama, kao i u prehrambenoj industriji (npr. nisin kao prehrambeni aditiv) i stočarstvu.⁹

2.4. Farmakološki izazovi i strategije dizajna boljih AMP-ova

Unatoč snažnoj *in vitro* aktivnosti, klinička primjena AMP-ova ograničena je smanjenom učinkovitošću u organizmu zbog fizioloških uvjeta (visoka ionska jakost, vezanje za serumske proteine, razgradnja enzimima), mogućom citotoksičnošću te nepovoljnom farmakokinetikom.^{6,9} Iako je razvoj rezistencije rjeđi nego kod klasičnih antibiotika, bakterije ipak mogu razviti adaptivne obrambene mehanizme.⁶

Stoga se novi AMP-ovi razvijaju racionalnim dizajnom i kemijskim modifikacijama (npr. ugradnja D-aminokiselina, ciklizacija, lipidacija) radi povećanja stabilnosti i selektivnosti,^{2,7,9} uz razvoj sintetskih mimetika i primjenu nanonosaa.⁶ Sve važniju ulogu imaju računalni alati i umjetna inteligencija koji ubrzavaju optimizaciju sekvenci i identifikaciju obećavajućih kandidata.^{6,11}

§ 3. NOVI ANTIMIKROBNI PEPTID KAO POTENCIJALNA TERAPIJA

Bakterijska upala pluća i dalje je jedna od vodećih respiratornih infekcija te značajan globalni problem zdravstva zbog visokog pobolijevanja i smrtnosti, osobito jer patogeni poput *Staphylococcus aureus* i *Klebsiella pneumoniae* sve češće razvijaju rezistenciju na antibiotike. Stoga je vrlo važno raditi na pronalasku novih antimikrobnih lijekova.

U ovom seminaru opisan je linearni širokospektralni antimikrobni peptid (AMP 1003) koji pokazuje značajnu terapijsku učinkovitost kod liječenja bakterijske upale pluća.¹²

3.1. Dizajn i karakterizacija AMP 1003

AMP 1003 je linearni antimikrobni peptid sastavljen od četiri ponavljajuće jedinice (D-triptofan)-(D-arginin)-(D-lizin), sintetiziran standardnom Fmoc metodom čvrste faze. Pri fiziološkom pH nosi neto naboj +9 te pokazuje nisku hidrofobnost, što mu omogućuje dobru topljivost u vodi. Ima povoljan farmakokinetički profil: nisko vezanje za plazmatske proteine (oko 20 %), umjeren volumen distribucije (0,1 L/kg) te vrijeme poluživota od približno 2 sata. Analiza cirkularnog dikroizma pokazala je da AMP 1003 nema uređenu strukturu u vodenom i membranski-mimetičkom okolišu, pri čemu autori ističu da jasno definirana sekundarna struktura nije nužan preduvjet za antimikrobnu aktivnost.¹²

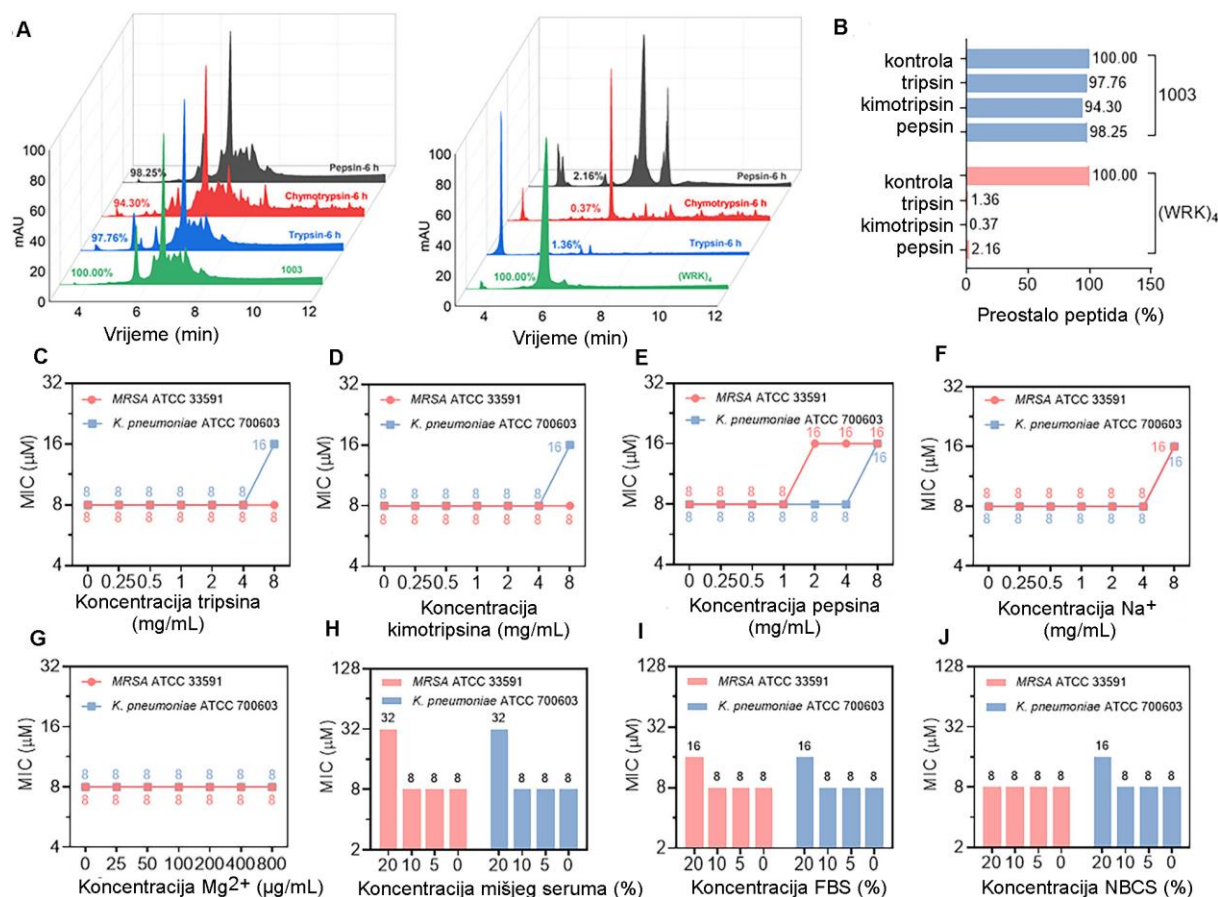
3.2. Antimikrobna aktivnost, selektivnost i stabilnost AMP 1003

AMP 1003 pokazao je antimikrobnu aktivnost na širokom spektru bakterijskih sojeva, s MIC vrijednostima od 8 μM protiv MRSA ATCC 33591 i *K. pneumoniae* ATCC 700603. Protiv kliničkih višestruko rezistentnih izolata zadržao je snažnu aktivnost: 4–8 μM za MRSA MDR1-6 te 16–128 μM za *K. pneumoniae* MDR1-5, u usporedbi s konvencionalnim antibioticima koji su bili manje učinkoviti (tobramicin, gentamicin, ciprofloksacin, levofloksacin, imipenem) ili čak nisu pokazivali aktivnost (piperacilin, cefotaksim). Također je djelovao brže baktericidno od vankomicina protiv MRSA i polimiksina B protiv *K. pneumoniae*.¹²

Peptid je pokazao vrlo dobru biokompatibilnost: zanemarivu hemolitičku toksičnost ($\text{HC}_{10} > 2048 \mu\text{M}$) i nisku citotoksičnost (IC_{50} 64–128 μM). Selektivni indeks (SI; omjer HC_{10} i

geometrijske sredine minimalne inhibitorne koncentracije, MIC) za BV-2 stanice bio je >512 , znatno iznad klinički relevantnog praga ($SI > 10$).¹²

Zamjena L-aminokiselina D-aminokiselinama značajno je povećala proteolitičku stabilnost. Više od 90 % peptida ostalo je intaktno nakon 6 sati izlaganja tripsinu, kimotripsinu ili pepsinu, dok je analogan spoj sastavljen od L-aminokiselina pokazivao <10 % stabilnosti. Aktivnost je očuvana i u prisutnosti fizioloških koncentracija soli i seruma (slika 2).¹²

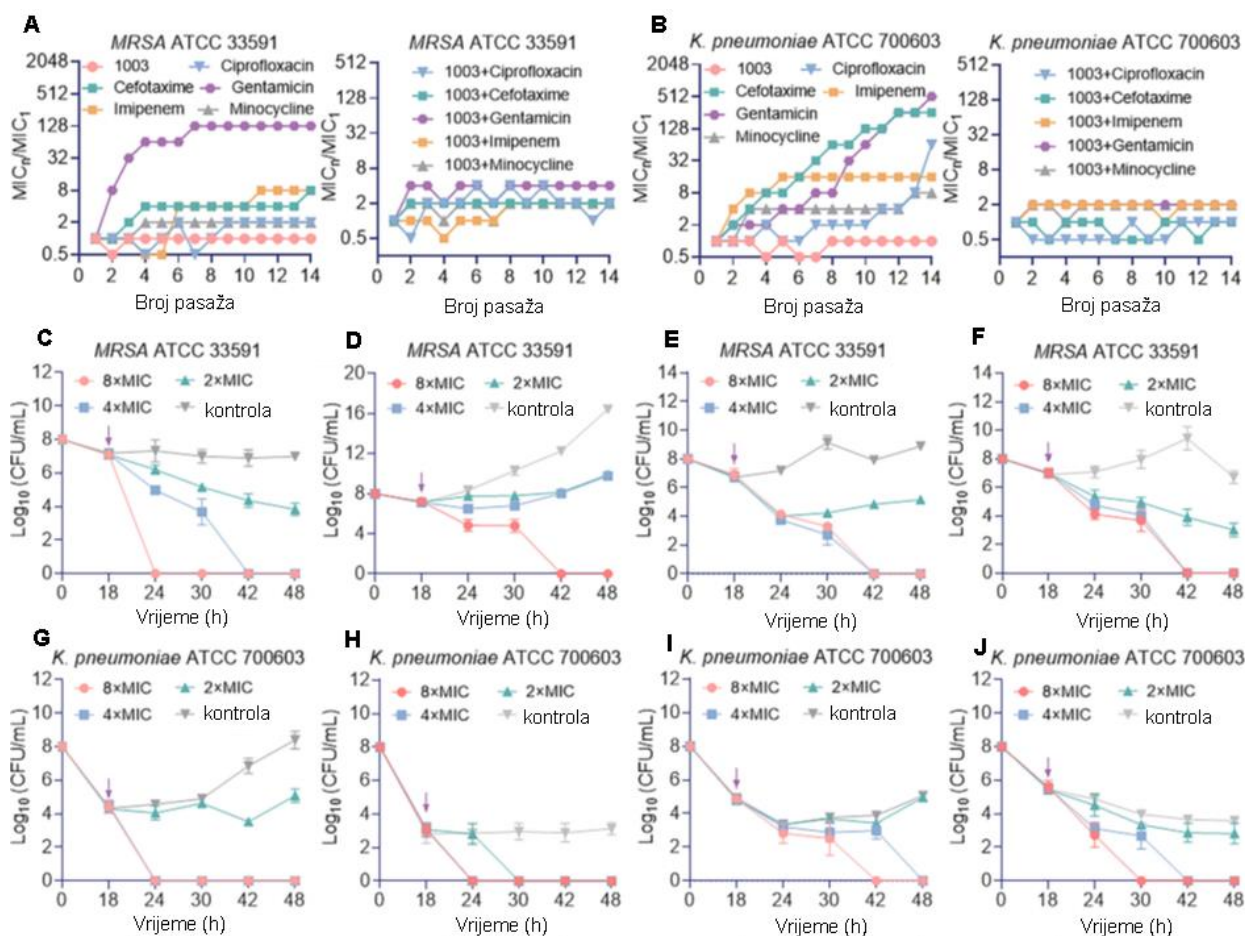


Slika 2. AMP 1003 pokazuje visoku stabilnost. RP-HPLC analiza AMP 1003 i (WRK)₄ nakon inkubacije s tripsinom, kimotripsinom i pepsinom tijekom 6 h pri 37 °C (A, B). MIC vrijednosti AMP 1003 protiv MRSA ATCC 33591 i *K. pneumoniae* ATCC 700603 u prisutnosti tripsina (C), kimotripsina (D), pepsina (E), Na⁺ (F), Mg²⁺ (G), mišjeg seruma (H), fetalnog goveđeg seruma (FBS; I) i seruma novorođenog teleta (NBSC; J). Slika prilagođena prema izvoru.¹²

3.3. AMP 1003 smanjuje razvoj antimikrobne rezistencije

AMP 1003 pokazao je sinergističke ili aditivne učinke u kombinaciji s konvencionalnim antibioticima protiv standardnih i MDR sojeva. U serijskim pasažnim eksperimentima tijekom 14 generacija nije došlo do značajnog porasta rezistencije (≤ 4 puta povećanje MIC), dok su konvencionalni antibiotici inducirali višestruki porast rezistencije. Kombinacija antibiotika u subinhibitornoj koncentraciji ($1/2$ njihovih MIC vrijednosti) s AMP 1003 učinkovito je sprječavala razvoj rezistencije (slika 3).¹²

Peptid je izazvao unakrsnu rezistenciju jedino s gentamicinom kod MRSA ATCC 33591 te gentamicinom i imipenemom kod *K. pneumoniae* ATCC 700603, dok s ostalim antibioticima nije bilo unakrsne rezistencije. Pri subinhibitornim koncentracijama vraćao je osjetljivost bakterija na antibiotike. Također je eliminirao persister stanice (mogu podnijeti visoke koncentracije antibiotika, slika 3) te inhibirao stvaranje biofilma.¹²



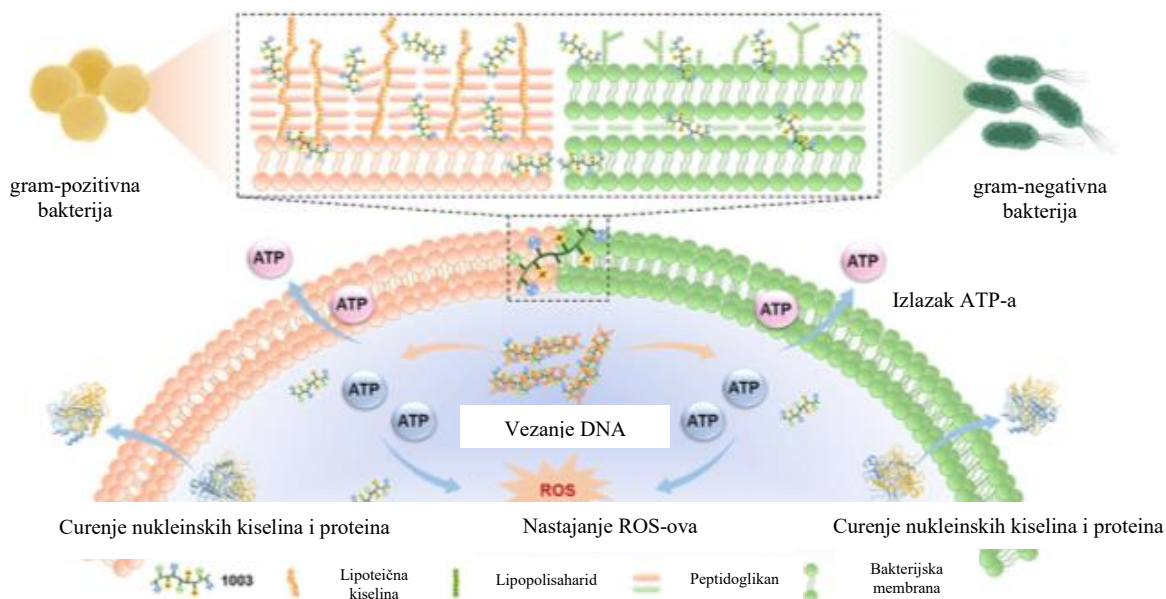
Slika 3. AMP 1003 smanjuje razvoj antimikrobne rezistencije. Razvoj rezistencije kod MRSA ATCC 33591 (A) i *K. pneumoniae* ATCC 700603 (B) u prisutnosti sub-MIC koncentracije AMP 1003, antibiotika ili njihove kombinacije. Kinetika baktericidnog djelovanja AMP 1003 na persister stanice MRSA ATCC 33591 nastale nakon tretmana 10× MIC koncentracijom ciprofloksacina (C), gentamicina (D), imipenema (E) ili minociklina (F), $n = 3$ neovisna ponavljanja. Kinetika baktericidnog djelovanja AMP 1003 na persister stanice *K. pneumoniae* ATCC 700603 nastale nakon tretmana 10× MIC koncentracijom ciprofloksacina (G), gentamicina (H), imipenema (I) ili minociklina (J), $n = 3$ neovisna ponavljanja. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Točke predstavljaju medijan, a linije pogreške raspon vrijednosti. Slika prilagođena prema izvoru.¹²

3.4. Višestruki mehanizmi djelovanja AMP 1003

Mehanistička ispitivanja pokazala su da AMP 1003 djeluje i na membranu i unutarstanično. Ostvaruje interakcije s lipopolisaharidima i lipoteičnim kiselinama, ali ne i s fosfatidilkolinom,

potvrđujući selektivnost prema bakterijskim membranama. Povećava permeabilnost i depolarizaciju membrane te uzrokuje oštećenja površine membrane.¹²

Unutar stanice, veže bakterijsku DNA te interferira s replikacijom i transkripcijom, inducira nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*), uzrokuje istjecanje staničnih sadržaja te remeti homeostazu adenozin trifosfata (ATP). Predloženi model uključuje početno elektrostatsko vezanje na membranu, destabilizaciju membrane, ulazak u stanicu i višestruko narušavanje staničnih procesa, što otežava razvoj rezistencije (slika 4).¹²



Slika 4. Predloženi mehanizam antimikrobnog djelovanja AMP 1003 uključuje: interakciju pozitivno nabijenih bočnih ogranaka s negativno nabijenim komponentama bakterijske membrane (lipopolisaharidima kod gram⁺ te lipoteičnom kiselinom kod gram⁻ bakterija), prodiranje hidrofobnih triptofanskih bočnih ogranaka u lipidni dvosloj uz depolarizaciju i oštećenje membrane, dok unutar stanice peptid veže DNA, inducira nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta i narušava energetski metabolizam. Slika prilagođena prema izvoru.¹²

3.5. Analiza transkriptoma

RNA-seq analiza nakon tretmana MRSA i *K. pneumoniae* s AMP 1003 u koncentracijama 2× i 4× MIC pokazala je koncentracijski ovisne promjene u ekspresiji gena, pri čemu su obrasci odgovora bili različiti između gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Kod MRSA peptid je potaknuo ekspresiju gena uključenih u popravak membrane i odgovor na oštećenje DNA, dok su geni za metabolizam i transport bili smanjeno ekspimirani. Kod *K. pneumoniae* došlo je do smanjenja ekspresije gena povezanih s propusnošću membrane i obrambenim odgovorom na

stres. Kod obje vrste uočeno je ometanje transporta i funkcije transmembranskih sustava, što sugerira potencijal AMP 1003 da inhibira mehanizme rezistencije poput efluksa, podržavajući njegovu ulogu i kao samostalnog antimikrobnog sredstva i kao adjuvansa u antibiotskoj terapiji.

12

3.6. Terapijska učinkovitost u mišjim modelima upale pluća i protuupalna aktivnost

AMP 1003 je testiran u mišjim modelima upale pluća izazvane bakterijama MRSA i *K. pneumoniae*. Miševi su prvo imunokompromitirani uz djelovanje ciklofosfamida, a zatim zaraženi. AMP 1003 je značajno smanjio bakterijsko opterećenje pluća pri dozama od 5 i 10 mg/kg, često bolje od usporednih antibiotika (vankomicin za MRSA, polimiksin B za *K. pneumoniae*). Za razliku od usporednih antibiotika, AMP 1003 djeluje široko protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Histopatološki, liječenje je gotovo u potpunosti obnovilo plućno tkivo, dok su miševi tretirani fiziološkom otopinom pokazali teška oštećenja.

Osim antimikrobnog djelovanja, AMP 1003 ima i snažna protuupalna svojstva. U mišjim stanicama RAW 264.7 i u miševima smanjio je koncentraciju više pro-upalnih citokina (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-17, IL-18, iNOS, MCP1, CD86), čime ublažava oštećenja uzrokovana pretjeranom upalom.¹²

3.7. Sigurnosni profil *in vivo*

AMP 1003 je pokazao znatno bolji sigurnosni profil od polimiksina B u testovima akutne toksičnosti kod miševa. Pri dozama do 30 mg/kg nije uzrokovao smrtnost niti ozbiljne simptome, dok su miševi tretirani polimiksinom B već pri 20 mg/kg pokazivali teške znakove toksičnosti, a pri 30 mg/kg svi uginuli unutar sat vremena. Čak i pri 40 mg/kg smrtnost kod AMP 1003 bila je samo 25%, uz privremene abnormalnosti u ponašanju preživjelih životinja.

Biokemijske analize krvi nisu pokazale značajnu hepatotoksičnost ni nefrotoksičnost pri svim testiranim dozama, a rani biomarkeri oštećenja bubrega ostali su nepromijenjeni. Histološki, AMP 1003 izazvao je tek blagu infiltraciju upalnih stanica i minimalna oštećenja pri najvišoj dozi, dok je polimiksin B izazvao znatno teža oštećenja tkiva. Biodistribucija je pokazala primarnu akumulaciju u jetri i bubrezima s postupnim smanjenjem koncentracije.

Razlika u sigurnosnom profilu objašnjava se različitim metaboličkim ponašanjem: polimiksin B se nakuplja u bubrezima i teško razgrađuje, dok organizam može neutralizirati

potencijalnu toksičnost AMP 1003 kroz antioksidativne i regenerativne mehanizme, što rezultira povoljnijim *in vivo* učinkom.¹²

§ 4. ZAKLJUČAK

AMP 1003 predstavlja značajan napredak u dizajnu antimikrobnih peptida, učinkovito prevladavajući ključna ograničenja, koja otežavaju njihovu kliničku primjenu, poput slabe proteolitičke stabilnosti, visoke citotoksičnosti i potencijala za izazivanje bakterijske rezistencije. Racionalnom zamjenom L-aminokiselina njihovim D-enantiomerima unutar ponavljajućeg motiva triptofan-arginin-lizin, peptid je pokazao znatno poboljšanu otpornost na proteolitičku razgradnju u usporedbi s prethodnikom (WRK)₄, zadržavajući više od 90 % integriteta nakon izloženosti probavnim enzimima. AMP 1003 ima širokospektralnu antimikrobnu aktivnost protiv klinički relevantnih multirezistentnih patogena, uključujući MRSA i *K. pneumoniae*.

AMP 1003 djeluje putem više mehanizama kombinirajući narušavanje stabilnosti membrane s unutarstaničnim djelovanjem, poput vezanja na DNA, generiranja reaktivnih kisikovih vrsta i ometanje metabolizma. Tim načinom djelovanja razvoj bakterijske rezistencije je otežan u usporedbi s konvencionalnim antibioticima koji djeluju na jednu metu.

Peptid je pokazao sposobnost vraćanja osjetljivosti na antibiotike u rezistentnim sojevima i eliminacije persister stanica, što ga čini korisnim i kao samostalni antimikrobni agens i kao adjuvans u konvencionalnoj antibiotskoj terapiji. Dodatna protuupalna aktivnost *in vitro* i *in vivo* daje još jednu terapijski vrijednu dimenziju.

Rezultati *in vivo* posebno su ohrabrujući, AMP 1003 smanjio je broj bakterija u zaraženom tkivu usporedivo s vankomicinom i polimiksinom B, uz znatno povoljniji sigurnosni profil. Ipak, prije kliničke primjene potrebno je riješiti nekoliko izazova: farmakokinetika u pacijenata s oštećenjem organa, potencijalna imunogenost pri ponovljenoj primjeni i učinkovitost u kroničnim ili duboko smještenim infekcijama još nisu u potpunosti istraženi. Unatoč tome, AMP 1003 pruža snažnu osnovu za daljnji razvoj racionalno dizajniranih antimikrobnih peptida kao terapiju sljedeće generacije protiv rezistentnih bakterijskih infekcija.¹²

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. J. Soni, S. Sinha, R. Pandey. Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA 2024.
2. C.D. Fjell, J.A. Hiss, R.E.W. Hancock, G. Schneider. Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group 2012, pp 37–51.
3. A. Dowling, J. O’ Dwyer, C.C. Adley. Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. In *Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance*; A. Méndez-Vilas, Ed.; **2017**.
4. E. Etebu, I. Ariekpar. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *IJAMBR* **2016**, 4, 90–101.
5. E.M. Halawa, M. Fadel, M.W. Al-Rabia, et al. Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media SA 2023.
6. N.G. Oliveira Júnior, C.M. Souza, D.F. Buccini, M.H. Cardoso, O.L. Franco. Antimicrobial peptides: structure, functions and translational applications. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research November 1, 2025, pp 687–700.
7. J.M. Ageitos, A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata, T.G. Villa. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc. June 1, 2017, pp 117–138.
8. A.H. Benfield, S.T. Henriques. Mode-of-Action of Antimicrobial Peptides: Membrane Disruption vs. Intracellular Mechanisms. *Frontiers in Medical Technology*. Frontiers Media S.A. 2020.
9. Y. Huan, Q. Kong, H. Mou, H. Yi. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. October 16, 2020.
10. Q.Y. Zhang, Z. Bin Yan, Y.M. Meng, et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*. BioMed Central Ltd December 1, 2021.
11. Y. Wang, L. Zhao, Z. Li, et al. A generative artificial intelligence approach for the discovery of antimicrobial peptides against multidrug-resistant bacteria. *Nat. Microbiol.* **2025**, 10 (11), 2997–3012.
12. C. Zhong, Y. He, J. Zou, et al. An antimicrobial peptide as a potential therapy for bacterial pneumonia that alleviates antimicrobial resistance. *Nature Communications* **2025** 16:1 **2025**, 16 (1), 10488-.