Nove strategije u istraživanjima i razvoju antimikrobnih lijekova

Pašalić, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:319397

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Veterinarski fakultet

Sveučilište u Zagrebu

Laura Pašalić

Nove strategije u istraživanjima i razvoju antimikrobnih lijekova

Diplomski rad

Zagreb, 2019

Zavod za farmakologiju i toksikologiju

Predstojnik: Doc. dr. sc. Jelena Šuran

Mentor: Doc. dr. sc. Jelena Šuran

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Frane Božić
2. Izv. prof. dr. sc. Ozren Smolec
3. Doc. dr. sc. Jelena Šuran
4. Prof. dr. sc. Andrea Prevendar Crnić

Popis kratica

AMP- antimikrobni peptidi

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

ESBL- beta-laktamaze proširenog spektra djelovanja (engl. *extended spectrum beta-lactamases*)

MAb- monoklonsko protutijelo (engl. *monoclonal antibody*)

MIk- minimalna inhibicijska koncentracija

PBP- protein koji veže penicilin (*penicilin binding protein*)

RNA- ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

T3SS- tip 3 injekcijskog sustava (engl. *type 3 injection system*)

T4SS- tip 4 injekcijskog sustava (engl. *type 4 injection system*)

T6SS- tip 6 injekcijskog sustava (engl. *type 6 injection system*)

QS- kvorumsko očitavanje (engl. *quorum sensing*)

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. Razvoj antibiotika kroz povijest ... 1
1.2. Opravdana i razumna uporaba antimikrobnih lijekova ... 2
1.3. Podjela antibiotika prema načinu djelovanja ... 3
1.3.1. Inhibitori sinteze stanične stijenke ... 4
1.3.2. Antibiotici koji oštećuju staničnu membranu i remete funkciju stanice ... 7
1.3.3. Inhibitori sinteze nukleinskih kiselina ... 8
1.3.4. Inhibitori sinteze bakterijskih proteina ... 10
1.4. Antimikrobna rezistencija ... 11
1.4.1. Povijest nastanka antimikrobne rezistencije ... 11
1.5. Mehanizmi antimikrobne rezistencije ... 13
1.5.1. Genetska osnova antimikrobne rezistencije ... 13
1.5.2. Mehanistička osnova antimikrobne rezistencije ... 16
1.6. Načini prijenosa rezistencije sa životinja na ljude ... 19
1.6.1. Prijenos rezistentnih sojeva bakterija hranom ... 19
1.6.2. Prijenos gena za rezistenciju izravnim dodirom sa životinjama koje se uzgajaju za hranu ... 20
1.6.3. Prijenos gena za rezistenciju izravnim dodirom s kućnim ljubimcima ... 20
1.6.4. Prijenos rezistencije u okolišu ... 21
2. NOVE STRATEGIJE U RAZVOJU ANTIMIKROBNIH LIJEKOVA ... 23
2.1. Alternativne strategije u borbi protiv bakterijskih infekcija ... 23
2.2. Pregled nekih od trenutnih pristupa koji se koriste za razvoj alternativnih antimikrobnih terapija ... 23
2.2.1. Zaštita putem inaktiviranja antitijela ... 24
2.2.2. Blokiranje vezivanja mikroorganizama ... 26
2.2.3. Identifikacija molekula koje pružaju zaštitu od specifičnih faktora virulencije ... 29
2.2.4. Inhibitori međustanične komunikacije ... 30
2.2.5. Strategija trojanskog konja ... 32
2.3. Pitanje polimikrobnih zajednica ... 32
3. NEKONVENCIONALNI PRISTUPI U LIJEČENJU BAKTERIJSKIH BOLESTI ... 32

3.1. Antimikrobni peptidi 34
3.1.1. Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida 35
3.1.2. Razvoj rezistencije na AMP-e 37
3.1.3. Klasifikacija antimikrobnih peptida 38
3.2. Bakteriofagi 39
3.3. Imunomodulacija 40
4. ZAKLJUČAK 45
5. LITERATURA 46
6. SAŽETAK 52
7. SUMMARY 53
8. ŽIVOTOPIS 54

1. UVOD

1.1. Razvoj antibiotika kroz povijest

Početak moderne „antibiotske ere“ obično povezujemo s imenima Paula Ehrlicha i Alexandera Fleminga. Ehrlichova zamisao o „magičnom metku“ koji selektivno cilja samo mikrobe koji uzrokuju bolest, a ne domaćina, temeljila se na opažanju da anilin i druge sintetičke boje, koje su u to vrijeme postale dostupne, mogu obojiti određene mikrobe, ali ne i druge. Godine 1903. Ehrlich je izumio boju, prvu kemoterapeutsku tvar, *Trypan Red,* koja je bila prvi lijek koji je pokazao aktivnost protiv tripanosomalnih infekcija u miševa. Najveći uspjeh Ehrlicha, međutim, bio je otkriće (1910.) organskog arsenskog lijeka Salvarsan (arsfenamin). Ehrlich je tvrdio da se mogu sintetizirati kemijski spojevi koji bi „mogli potpuno djelovati isključivo na parazite koji se nalaze u organizmu“. Ta ga je ideja dovela do toga da započne opsežan pokus 1904. kako bi pronašao lijek protiv sifilisa. U svom laboratoriju sintetizirao je stotine organoarsenskih spojeva i testirao ih na kunićima inficiranima sifilisom. Godine 1909. naišli su na šesti spoj u 600. seriji koji je izliječio kuniće zaražene sifilisom. Unatoč zamornom postupku injekcija i nuspojavama, lijek koji je Hoechst prodao pod nazivom Salvarsan bio je veliki uspjeh, i zajedno s Neosalvarsanom uživao status najčešće propisanog lijeka do njegove zamjene penicilinom 1940-ih (LIOYD i sur., 2005.). Sistematski pristup odabiru lijekova koji je uveo Ehrlich postao je kamen temeljac strategija pretraživanja lijekova u farmaceutskoj industriji. Ovaj je pristup doveo do otkrića sulfonskih lijekova, od kojih je prvi bio boja, prontozil (sulfamidokrizoidin) kojeg je sintetizirao Bayerov kemičar Domagk (AMINOV, 2010.).

Prvi otkriveni antibiotik bio je penicilin. Slučajno ga je otkrio škotski znanstvenik Alexandar Fleming 1928. godine provodeći istraživanja na stafilokoku. Otvorenu Petrijevu zdjelicu s bakterijama ostavio je blizu prozora i nakon nekog vremena uočio da su se razvile spore plijesni. Fleming je također uočio da su bakterije u blizini plijesni umirale. Nakon toga izolirao je te plijesni te ustanovio da se radi o rodu *Penicillium*. Ustanovio je da su učinkovite protiv svih Gram-pozitivnih patogena. Fleming je primijetio da to nije plijesan sama po sebi, već „neki sok“ koje su plijesni prozvele. Produkt tih plijesni, koji je ubijao bakterije, nazvao je penicilin (TAN i TATSUMURA, 2015.).

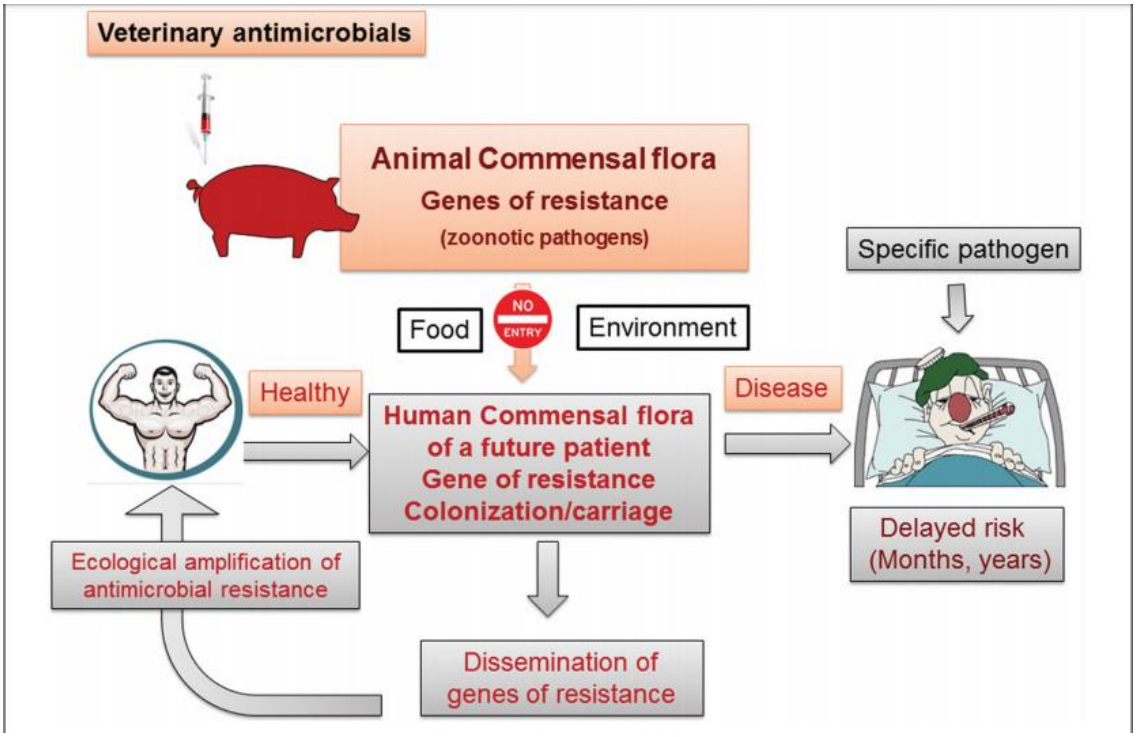
Otkriće ova prva tri antimikrobna lijeka, Salvarsan, Prontosil i penicilin, postavilo je paradigmu za buduća istraživanja o otkrivanju lijekova. Razdoblje između 1950.-ih i 1970.-ih godina prošlog stoljeća bilo je uistinu zlatno doba otkrića novih skupina antibiotika, a od tada nisu pronađene nove skupine. Stoga, s opadanjem stope otkrivanja, glavni pristup za razvoj novih lijekova za borbu protiv nastanka i ponovne pojave otpornosti patogena na antibiotike je modifikacija postojećih antibiotika (CHOPRA i sur., 2012.).

1.2. Opravdana i razumna uporaba antimikrobnih lijekova

Otpornost na antimikrobne lijekove postoji oduvijek, no taj urođeni oblik otpornosti na antibiotike ne predstavlja opasnost za zdravlje ljudi i životinja. Stvarna opasnost je stečena rezistencija nastala zbog genskih promjena u samoj bakteriji ili zbog prijenosa genetičkog materijala koji nosi informaciju o rezistenciji na ostale srodne ili nesrodne mikrobe. Širenje antimikrobne rezistencije ne poznaje ekološke granice pa se prijenos rezistentnih bakteriijskih vrsta sa životinja na čovjeka odvija različitim putevima, a najčešće hranom i vodom koja je izravno ili neizravno bila u doticaju sa životinjama. (ŠEOL i sur., 2010.).

Kako bi se smanjila uporaba antibiotika i tako smanjio razvoj rezistencije u veterinarskoj medicini, u Njemačkoj su u prosincu 2000. objavljene obvezne smjernice za racionalnu uporabu antibakterijskih tvari u životinja. Ove smjernice opisuju minimalne zahtjeve koje veterinari moraju slijediti prilikom primjene antibiotika za životinja. Ključni elementi smjernica su uporaba antibiotika na temelju točne dijagnoze, izbor najprikladnije antibakterijske tvari, ograničena upotreba antibiotika, što znači korisiti ih kada je zaista nužno potrebno te pridržavanje uputa na deklaraciji. Sva odstupanja od preporuka smjernica moraju biti zabilježena (UNGEMACH i sur., 2006.).

Upotreba antibiotika u stočnoj hrani također je pogodovala širenju antimikrobne rezistencije. Osobito je opasno što se antimikrobni lijekovi u životinja ne koriste samo u terapijske svrhe nego profilaktički, metafilaktički te kao promotori rasta (FAIR i TOR, 2014.). Mehanizmi djelovanja na poticanje rasta nisu u cjelosti poznati, no znanstvenici se zalažu za to da se njihova primjena svede na minimum tako da se poboljšaju uvjeti i način držanja te higijena kako bi se umanjila mogućnost infekcije životinja (ŠEOL i sur., 2010.).



Slika 1. Prijenos gena rezistencije sa životinja na ljude (TOUTAIN i sur., 2016).

Predviđa se da će se potrošnja antimikrobnih lijekova korištenih u životinja za proizvodnju hrane povećati u nadolazećim desetljećima. Razborita uporaba antimikrobnih lijekova neće biti dostatna da se zaustavi rast antimikrobne rezistencije u ljudi koja potječe od životinja. Alternative za antimikrobne lijekove nisu dostupne ili nisu provedive, stoga postoji hitna potreba za razvojem novih antimikrobnih lijekova koji će se koristiti u životinja za proizvodnju hrane. To je prvenstveno potrebno, ne radi zdravlja životinja, već da se prekine veza između rezistencije koja se javlja kod sojeva u ljudi i životinja (TOUTAIN i sur., 2016.).

1.3. Podjela antibiotika prema načinu djelovanja

Od 1910. razvijeni su mnogi antibiotici s različitim mehanizmima djelovanja, uključujući: (1) inhibiciju sinteze stanične stijenke bakterija; ova skupina antibiotika uključuje vankomicin i β-

laktamske antibiotike kao što su penicilini, cefalosporini i karbapenemi, (2) inhibicija sinteze proteina uključujući tetracikline, aminoglikozide, makrolide i kloramfenikol i (3) inhibitore sinteze DNA kao što su fluorokinoloni i sulfonamidi koji inhibiraju sintezu folne kiseline. (KARAMAN i JUMAA, 2015.).

Pojam antibiotik nastao je iz riječi „antibiosis“ što u doslovnom prijevodu znači „protiv života“. U prošlosti, antibiotici su smatrani organskim spojevima koje proizvodi jedan mikroorganizam koji su toksični za drugi mikroorganizam (RUSSELL, 2004.). Kao rezultat toga antibiotik je izvorno definiran kao tvar koju proizvodi jedan mikroorganizam, ili tvar biološkog podrijetla, koja u niskim koncentracijama može inhibirati rast, odnosno djelovati smrtonosno na drugi mikroorganizam (DENYER i sur., 2004.).

Međutim ova je definicija izmijenjena u novije doba kako bi uključila i one antibiotike koji su djelomično ili potpuno proizvedeni iz sintetičkih tvari. Dok neki antibiotici mogu potpuno ubiti bakterije, neki mogu samo spriječiti njihov rast. Oni koji ubijaju bakterije nazvani su baktericidima, a oni koji inhibiraju rast bakterija, bakteriostaticima. (VON DÖHREN, 2009.). Bakteriostatici pri velikim koncentracijama također mogu imati baktericidno djelovanje (BHATTACHARJEE, 2016.). Antibiotici su lijekovi koji su selektivno toksični za bakterije, a netoksični, odnosno prihvatljivo toksični za organizam domaćina (KALENIĆ i sur., 2013.).

Prema mehanizmu djelovanja na bakterije, antimikrobne lijekove možemo razvrstati u četiri skupine:

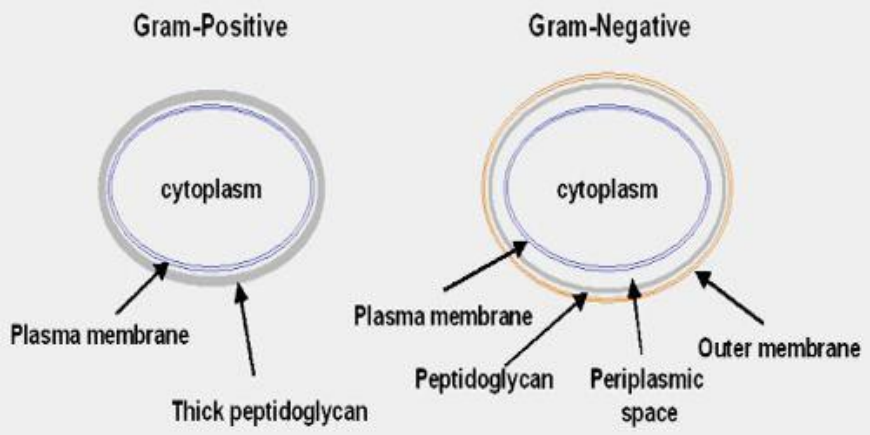
1. Lijekovi koji inhibiraju sintezu stanične stijenke bakterija;
2. Lijekovi koji oštećuju citoplazminu membranu;
3. Lijekovi koji sprječavaju sintezu ili funkcioniranje nukleinskih kiselina;
4. Lijekovi koji inhibiraju sintezu bakterijskih bjelančevina.

1.3.1. Inhibitori sinteze stanične stijenke

Najbrojniji i ujedno najvažniji antibakterijski pripravci su inhibitori sinteze stanične stijenke bakterija. To su β-laktamski antibiotici (penicilini i cefalosporini), bacitracin i

vankomicin. Da bismo razumjeli mehanizme djelovanja tih antibiotika, potrebno je podsjetiti se građe gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (ŠEOL i sur., 2010.).

Bakterijska stanična stijenka izvana okružuje staničnu memabranu i štiti unutarnje dijelove bakterijske stanice. Kod gram-pozitivnih bakterija stanična stijenka sastoji se najvećim dijelom od peptidoglikana, koji stijenci daje čvrstoću i održava unutarstanični osmotski tlak. U gram-negativnih bakterija stanična je stijenka tanja, a unutarnji stanični osmotski tlak znatno niži. I gram-negativne bakterije sadržavaju peptidoglikan, ali u vrlo maloj količini. Peptidoglikan se nalazi u prostoru između citoplazmine i vanjske membrane i kovalentno je povezan s lipoproteinima vanjske membrane. Ta je membrana negativno nabijena što je čini otpornom na fagocitozu i služi kao zapreka prodoru nekih tvari, primjerice antibiotika penicilina (ŠEOL i sur., 2010.). Da bi ostala živa, bakterija mora sintetizirati peptidoglikan, a to čini pomoću enzima transpeptidaze, karboksipeptidaze i ostalih enzima koji sudjeluju u završnoj fazi sinteze peptidoglikana (PARK i UEHARA, 2008.). β-laktamski antibiotici sprječavaju sintezu stanične stijenke tako što koče aktivnost tih enzima. Ti enzimi poznati su kako proteini koji vezuju peniciline *(Penicillin Binding Proteins,* PBP), (ŠEOL i sur., 2010.). Dakle, penicilni se vežu na PBP i inaktiviraju ga te bakterijska stanica propada (KATZUNG, 2011.).



Slika 2. Građa ovojnica bakterijske stanice (KAPOOR i sur., 2017.)

Cefalosporini su slični penicilinima, ali su otporniji na β-laktamaze pa zbog toga imaju širi spektar djelovanja. Međutim pojava sojeva *E.coli* i *Klebsiella,* koji stvaraju β-laktamaze

proširenog spektra djelovanja (ESBL), koje mogu hidrolizirati većinu cefalosporina, postaju sve veći problem (KATZUNG, 2011.).

Inhibitori β-laktamaza su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam. B-laktamaze su enzimi koji razgrađuju β-laktamske antibiotike otvarajući β-laktamski prsten. Inhibitori β-laktamaze u kombinaciji s β-laktamima povećavaju njihovu učinkovitost u liječenju ozbiljnih infekcija uzrokovanih bakterijama iz porodice *Enterobacteriaceae* i na penicilin rezistentnih stafilokoknih bakterija (DRAWZ i BONOMO, 2010.).

Karbapenemi izvorno su razvijeni 1970-ih, karbapenemi se ubrajaju među najdjelotvornije antibiotike širokog spektra. Jedinstveno svojstvo karbapenema jest njihova sposobnost da inhibiraju i klasu A i klasu C β-laktamaza i njihov velik afinitet za bakterijske transpeptidaze i karboksipeptidaze koje sintetiziraju peptidoglikansku staničnu stijenku (PAPP-WALLACE i sur., 2011.).

Aztreonam je jedini komercijalno dostupan monobaktamski antibiotik, uskog spektra djelovanja. Aztreonam je aktivan samo protiv aerobnih gram-negativnih bakterija kao što su *Neisseria* i *Pseudomonas*. Koristi se za liječenje pneumonije, septikemije i infekcija mokraćnog sustava uzrokovanih tim bakterijama. Monobaktami nisu učinkoviti protiv gram-pozitivnih bakterija ili anaeroba (SYKES i sur., 1981.).

Peptidni antibiotici: bacitracin je polipeptidni antibiotik, proivod bakterije *Bacillus subtilis.* Djeluje tako da sprječava sintezu stanične stijenke interferirajući s defosforilacijom lipidnog spoja koji prenosi peptidoglikane na rastuću staničnu stijenku. Antibakterijski spektar bacitracina je gram-pozitivan i uključuje stafilokoke, streptokoke, *Corynebacterium* i *Clostridium* (KUMAR, 2017.).

Vankomicin je glikopeptidni antibiotik, fermentacijski proizvod bakterijske vrste *Streptomyces orientalis.* Djeluje tako što se veže na d-alanil-d-alanin prekursor stanične stijenke potreban za umrežavanje peptidoglikana i tako inhibira sintezu bakterijske stanične stijenke. Vankomicin djeluje baktericidno na većinu gram-pozitivnih aerobnih i anaerobnih bakterija (SCHILLING i sur., 2011.).

1.3.2. Antibiotici koji oštećuju staničnu membranu i remete funkciju stanice

Antibiotici koji oštećuju staničnu membranu, remete građu ili inhibiraju njezinu funkciju, ubijaju bakterijsku stanicu vrlo brzo. Cjelovitost citoplazmatske membrane i citoplazme od životne su važnosti za bakteriju. Antibiotici ove skupine obuhvaćaju poliksine, poliene, imidazole i monenzin. Zbog velike sličnosti fosfolipida koji su sastavni dio membrana eukariotskih organizama i eubakterija, njihovo je djelovanje nespecifično pa je zato njihova uporaba ograničena samo na lokalnu primjenu. Jedini antibiotici iz ove skupine koji imaju uporabnu vrijednost u kliničkoj praksi su polimiksini (ŠEOL i sur., 2010.).

Polimiksini su ciklični dekapeptidi koje tvori bakterija *Bacillus polymyxa.* To su kationski površinski aktivne tvari koje oštećuju fosfolipide stanične membrane i povećavaju permeabilnost slično kao i detergenti. Većinom djeluju na gram negativne bakterije vežući se na lipopolisaharide. Zbog puno veće količine fosfolipida u citoplazmi i vanjskoj membrani, gram-negativne bakterije mnogo su osjetljivije na polimiskine, nego gram-pozitivne (ŠEOL i sur., 2010.). Dva su polimiksina dostupna za kliničku uporabu: polimiksin B i kolistin i među njima postoji unakrižna rezistencija. Imaju uski antibakterijski spektar, uglavnom protiv gram-negativnih bakterija. Klinička primjena polimiksina smanjila se 1970.-ih zbog ranog iskustva nefrotoksičnosti i neurotiksičnosti nakon intravenske primjene; međutim brzo povećanje otpornosti na sve druge antibiotike zahtijevalo je njihovo ponovno oživljavanje u kliničkoj uporabi (VELKOV i sur., 2014.).

Monenzin je fermentacijski proizvod vrste *Streptomyces cinnamonensis* koji djeluje protiv gram-negativnih bakterija, nekih vrsta roda *Campylobacter*, *Brachyspira hyiodysenteriae,* kokcidija i toksoplazma. U buragu utječe na tvorbu hlapljivih masnih kiselina koje pridonose iskoristivosti krmiva, sprječava nadutost u teladi i ketozu u muznih krava. Donedavno je rabljen kao premiks u hranidbi teladi. Danas se u Hrvatskoj primjenjuje isključivo kao kokcidiostatik (ŠEOL i sur., 2010.).

1.3.3. Inhibitori sinteze nukleinskih kiselina

Metabolički putevi koji rezultiraju sintezom nukleinskih kiselina su vrlo bitni. Poremećaj sinteze nukleinskih kiselina onemogućava opstanak bakterijske stanice. Antibiotici iz ove skupine ometaju sintezu nukleinske kiseline inhibiranjem replikacije ili zaustavljanjem transkripcije (GALE i sur., 1981.). U ovu skupinu ubrajamo sljedeće lijekove: nitroimidazole, nitrofurane, nalidiksičnu kiselinu, fluorokinolone, novobiocin, rifampicin, sulfonamide, trimetoprim i 5-flucitozin (ŠEOL i sur., 2010.).

Nitrofurani su lijekovi širokog spektra djelovanja, ali se zbog toksičnosti, posebno kancerogenosti, primjenjuju isključivo lokalno. Mogu se primijeniti i u liječenju kožnih infekcija životinja koje ne služe za hranu (ŠEOL i sur., 2010.).

Nitroimidazoli su zabranjeni u životinja koje služe za proizvodnju hrane. Uglavnom se rabe za liječenje probavnih infekcija pasa. Učinkoviti su protiv anaerobnih bakterija i protozoa. Oni se pretvaraju u metabolite koji sprječavaju sintezu intracelularne bakterijske DNA. Glavni predstavnik nitroimidazola je metronidazol (SHENNAN, 2006.).

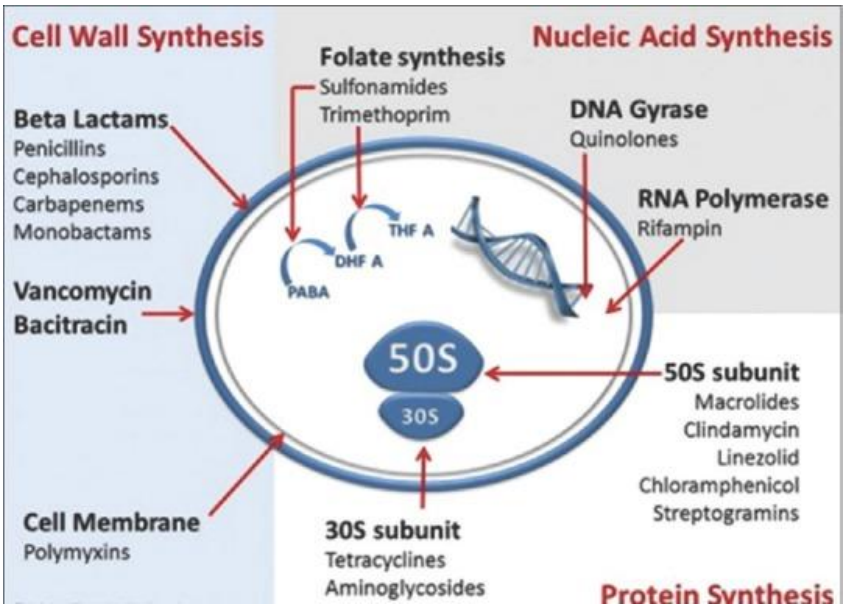
Fluorokinoloni obuhvaćaju veliku skupinu sintetskih antimikrobnih lijekova koji djelovanjem na bakterijski kromosomski materijal imaju baktericidni učinak na velik broj mikroba. Djelotvorni su protiv gram-negativnih aerobnih bakterija, ali na gram-pozitivne anaerobne bakterije gotovo i ne djeluju. U skupinu fluorokinolona spadaju enrofloksacin, enoksacin, danafloksacin, ciprofloksacin, ofloksacin, difloksacin, orbifloksacin i marbofloksacin (ŠEOL i sur., 2010.). Fluorokinoloni i kinoloni inhibiraju enzim DNA-girazu vezanjem na A podjedinicu enzima zbog čega bakterija nije u stanju replicirati ili čak sintetizirati proteine (MEHTA, 2011.).

Prvi kinolon koji je odobren za kliničku uporabu bila je nalidiksična kiselina koja je imala nekoliko bitnih nedostataka kao što su uzak spektar djelovanja, djelovala je toksično i loše se resorbirala nakon peroralne primjene. Kemijskom modifikacijom osnovne molekule kinolona, povrćana je sposobnost prodora kroz bakterijsku staničnu membranu, a istodobno je proširen antibakterijski spektar (ŠEOL i sur., 2010.).

Rifampicin se veže za β-podjedinicu bakterijske DNA ovisne RNA polimeraze i tako inhibira sintezu RNA. Rezistencija nastaje zbog točkastih mutacija u genu odgovornom za βpodjedinicu RNA polimeraze. Te mutacije dovode do smanjenog vezanja rifampicina. Koristi se najviše za liječenje mikobakterijskih infekcija, posebice tuberkuloze (KATZUNG, 2011.).

Sulfonamidi su sintetski lijekovi koji imaju široki antimikrobni spektar protiv mnogih mikroorganizama uključujući bakterije i neke protozoe kao što su *Toxsoplasma i Plasmodium.* Sulfonamidi su se ranije koristili mnnogo, sami ili u kombinaciji s trimetoprimom, za liječenje infekcija mokraćnog sustava, ali se više ne preporučuju zbog mogućih nuspojava (SCHOLAR, 2007.).

Novobiocin je bakteriostatski antibiotik, proizvod vrste iz roda *Streptomyces,* a koristi se gotovo isključivo u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijom *Staphylococcus aureus* te u liječenju mastitisa mliječnih krava. U kombinaciji s penicilinom i tetraciklinom ima umjeren sinergijski učinak. U veterinarskoj se praksi rabi za liječenje lokalnih infekcija uzrokovanih vrstom *S. aureus* (ŠEOL i sur., 2010.).



Slika 3. Mehanizmi djelovanja antibiotika (KAPOOR i sur., 2017.).

1.3.4. Inhibitori sinteze bakterijskih proteina

Sinteza proteina odvija se na ribosomima, prema kalupu mRNA na tRNA, koje služe kao adapteri između kalupa i aminokiselina koje se ugrađuju u protein. Bakterijski ribosomi sastoje se od dvije podjedinice, veće 50S i manje, 30S.

Manja podjedinica (30S) veže mRNA te se zatim taj kompleks veže na 50S podjedinicu. Nakon toga dolazi do vezanja aminoacil-tRNA na ribosom i slijedi sinteza proteina. Antibiotici inhibiraju sintezu proteina tako što se vežu na ribosome i inhibiraju različite faze translacije (COOPER i HAUSMAN, 2010.).

Aminoglikozidi su antibiotici razmjerno širokog spektra djelovanja. Većinom djeluju baktericidno protiv aerobnih bakterija i mikoplazma. U tu skupinu pripadaju streptomicin, neomicin, kanamicin, gentamicin, amikacin, tobramicin i dr. U kombinaciji s penicilinima djeluju sinergijski. Da bi iskazali svoj antibiotski učinak moraju prodrijeti u bakterijsku stanicu. Prodiranje može biti olakšano β-laktamskim antibioticima. Njihovo antibakterijsko djelovanje je usmjereno primarno prema aerobnim gram-negativnim bakterijama (ŠEOL i sur., 2010.).

Tetraciklini inhibiraju sintezu bakterijskih proteina sprječavanjem povezivanja aminoacil-tRNA s bakterijskim ribosomom. Stoga za interakciju s ciljnim jedinicama trebaju proći kroz jedan ili više membranskih sustava ovisno o tome je li osjetljivi organizam gram-pozitivan ili gram-negativan. U ovu skupinu spadaju klortetraciklin, oksitetraciklin, doksiciklin i minociklin (CHOPRA i ROBERTS, 2001.). Imaju široki spektar djelovanja uključujući bakterije, neke protozoe, *Rickettsiae* i *Ehrlichiae.* Koriste se u liječenju raznih infekcija, uključujući pneumoniju i infekcije mokraćnog sustava (PAPICH, 2011.).

Kloramfenikol se ireverzibilno veže na receptorska mjesta 50S podjedinice bakterijskog ribosoma i tako remeti sintezu novih peptida blokirajući aktivnost peptidil transferaze. Djeluje bakteriostatski na većinu gram-pozitivnih bakterija. Ne smije se istodobno primjenjivati s ostalim bakteriostatskim antibioticima (ŠEOL i sur., 2010.). Ima širok spektar djelovanja te osim na gram-pozitivne, djeluje i na gram-negativne bakterije, rikecije, spirohete i mikoplazme. Rezistencija na kolramfenikol se teško razvija (RIVIERE i PAPICH, 2018.).

Makrolidi (eritromicin, klaritromicin, azitromicin) se vežu na ribosomske podjedinice i inhibiraju sintezu bakterijskih proteina. Antimikrobni spektar obuhvaća uglavnom gram-pozitivne bakterije, osobito stafilokoke. U terapijskim dozama djeluje bakteriostatski. Mikroorganizmi postaju razmjerno brzo otporni na tu skupini antibiotika (RIVIERE i PAPICH, 2018.).

Linkozamidi (linkomicin, klindamicin, pirlimicin) inhibiraju sintezu proteina vežući se na 50S podjedinicu ribosoma. Djelovanje je usmjereno ponajprije protiv gram-pozitivnih bakterija. Linkomicin se upotrebljava za liječenje infekcija kod kojih mikroorganizmi nisu osjetljivi na druge antibiotike (RIVIERE i PAPICH, 2018.).

1.4. Antimikrobna rezistencija

1.4.1. Povijest nastanka antimikrobne rezistencije

Antibiotici su značajno unaprijedili medicinu tijekom kasne polovice 20. stoljeća, ali kako vrijeme prolazi uspjeh antibiotika bi mogao biti potpuno poništen njihovim borilačkim suparnicima: otpornim bakterijama. Ljudi su prekomjerno koristili antibiotike jednostavno tako što su ih primjenjivali u liječenju svih infekcija, od pneumonije do grlobolje, ali i uzimanjem prevelikog broja antibiotika, ili unošenjem u poljoprivredne sustave, životinje i prehrambene proizvode. Pretjerana uporaba antibiotika dovela je do toga da su bakterije razvile otporne sojeve kako bi se obranile od lijekova (BUSHAK, 2016.). Otkad postoje antibiotici, bakterijska rezistencija je postojala uz njih, ali nikada u ovako velikom opsegu. Bakterije su oduvijek činile ono u čemu su dobre, a to je pronalaženje načina za preživljavanje (BUSHAK, 2016.).

Godine 1943. penicilin je bio na putu masovne proizvodnje i koristio se za liječenje savezničkih trupa koje su se borile u Europi tijekom Drugog svjetskog rata. I prije nego su problemi s antimikrobnom rezistencijom nastali, Fleming je tijekom primanja Nobelove nagrade za medicinu izjavio sljedeće: „Doći će vrijeme kada će svatko moći kupiti penicilin u trgovinama. S druge strane postoji opasnost da si neuki čovjek aplicira manju dozu izlažući svoju mikrofloru nesmrtonosnim količinama lijeka i učini bakterije otpornima“ (BUSHAK, 2016.). Godine 1948. prijenos antibiotika iz medicine u poljoprivredu dogodio se slučajno. Robert Stokstad i Thomas Jukes radili su u tvrtki Lederle kako bi razvili „životinjski proteinski faktor“ koji bi mogao povećati

rast pilića i tako povećati profit u peradarstvu. Otkrili su da stanični ostaci bakterija *Streptomyces aureofaciens* - iz kojih su ekstrahirani tetraciklini – sadrže mnogo vitamina. Pilići koji su primali dodatke, uključujući *Streptomyces aureofaciens* porasli su 24% više od onih koji su primali ekstrakt jetre. Ovo otkriće pokrenulo je proces rutinskog ubrizgavnja antibiotika u životinje. U međuvremenu, u bolnicama su rasle rezistentne bakterije stafilokoka. Prema Harvard Magazinu, infekcije rezistentnim stafilokokima porasle su s 14% 1946. na 59% 1948. godine (AMINOV, 2010.).

Do 1952. godine, liječnici su bili donekle svjesni mogućnosti rezistencije na antibiotike, ali su ostali optimistični u pogledu novih lijekova koji bi mogli izliječiti bolesti koje su dugo plašile čovječanstvo, poput kolere i sifilisa. Studija o rezistenciji objavljena te godine zaključila je da se sifilis može liječiti „bez ikakvih naznaka povećane učestalosti rezistentnih infekcija, i taj rad daje osnovu za nadu da raširena upotreba penicilina neće rezultirati povećanom učestalošću infekcija rezitentnih na penicilin.“ Sljedećih nekoliko desetljeća smatralo se zlatnim razdobljem antibiotika zbog velikog broja novih lijekova koji su se razvili. U uzbuđenju koje je okruživalo uspjeh tih antibiotika, oni su brzo postali dostupni široj javnosti, poput penicilina, te naposljetku utirali put lakšem razvoju rezistencije (AMINOV, 2010.).

Godine 1955., kao što je Fleming predvidio, otpornost na penicilin postupno se povećavala zbog dostupnosti lijeka. Do tada, mnoge su zemlje pokušale usporiti nastanak otpornosti ograničavajući uporabu penicilina izdavanjem samo na recept, ali bilo je prekasno – mnogi bakterijski sojevi već su porazili antibiotik, uključujući stafilokoke. Godine 1960. u pokušaju da savladaju sojeve otporne na penicilin, znanstvenici su razvili meticilin, drugačiji antibiotik u skupini penicilina koji bi mogao djelovati protiv rezistencije. No u roku od godinu dana bakterijski su sojevi razvili otpornost i na meticilin – kasnije nazvani MRSA (meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*). Danas MRSA može odoljeti mnogim antibioticima, a infekcije su uobičajene u bolnicama i to ga čini jednim od najvećih prethodnika multirezistentnih bakterija. Godine 1976. na sveučilištu Tufts, liječnik Stuart Levy postao je jedan od prvih koji su otkrili otpornost na antibiotike zbog njihove uporabe u životinja. Te je godine radio na studiji koja je ispitivala kako male količine antibiotika u hrani za životinje mogu izazvati otpornost kod ljudi. Levy je na farmi hranio piliće tetraciklinima i otkrio da su bakterije otporne na tetracikline počele naseljavati crijevnu floru pilića u roku od tjedan dana. Godine 1990. zdravi ljudi su se počeli

razbolijevati jačim otpornim sojem MRSA-e i to je stvorilo veću javnu svijest o opasnosti od antimikrobne rezistencije (AMINOV, 2010.).

Do 2002. godine 60% slučajeva bolničkih infekcija *S. aureus* bilo je otporno na meticilin. U 2005. godini više od 100 000 amerikanaca oboljelo je od infekcije MRSA-om, a oko 20 000 je umrlo, što je više od broja ljudi koji su umirali od HIV-a i tuberkuloze zajedno. Godine 2013. nakon desetljeća pozivanja na akciju, FDA je konačno provela plan za ukidanje određene uporabe antibiotika u životinja. Međutim teško je identificirati u kojoj je mjeri ovaj plan učinkovit u smanjenju već učinjene velike štete (AMINOV, 2010.).

Danas od farmi do bolnica te svakodnevnih radnih mjesta, ljudi i životinje su vjerojatno puni različitih oblika otpornih bakterija. Stručnjaci naglašavaju da opasnost situacije leži u njezinoj složenosti. To nije jedan veliki izazov, riječ je o složenom problemu koji zahtijeva usklađene napore mikrobiologa, ekologa, zdravstvenih stručnjaka, radnika u zdravestvenoj i farmaceutskoj industriji. Zapravo, to bi trebala biti briga svih nas, jer na kraju uvijek postoji vjerojatnost da se netko od nas u nekom trenutku zarazi patogenom koji je otporan na antibiotsko liječenje (AMINOV, 2010.).

1.5. Mehanizmi antimikrobne rezistencije

1.5.1. Genetska osnova antimikrobne rezistencije

Bakterije imaju izvanrednu genetsku plastičnost koja im omogućava da odgovore na široku lepezu ekoloških prijetnji, uključujući prisutnost molekula antibiotika koje mogu ugroziti njihovo postojanje. Kao što je već spomenuto, bakterije koje dijele istu ekološku nišu s organizmima koji proizvode antimikrobne tvari, razvile su drevne mehanizme da izdrže učinak molekula antibiotik. Iz evolucijske perspektive, bakterije koriste dvije glavne genetske strategije za prilagodbu na „napad“ antibiotika: (1) mutacije u genima koje su često povezane s mehanizmom djelovanja spoja i (2) stjecanje stranog DNA kodiranja za determinante rezistencije horizontalnim prijenosom gena (MUNITA i ARIAS, 2016.).

Mutacija gena

Podskup bakterijskih stanica izvedenih iz osjetljive populacije razvija mutacije u genima koje utječu na aktivnost lijeka, što rezultira očuvanim staničnim preživljavanjem u prisutnosti antimikrobne molekule. Jednom kada se pojavi rezistentni mutant, antibiotik uklanja osjetljivu populaciju, a otporne bakterije prevladavaju. U mnogim slučajevima mutacijske promjene nisu povoljne za staničnu homeostazu i održavaju se samo ako je potrebno u prisutnosti antibiotika. Općenito, mutacije koje rezultiraju antimikrobnom rezistencijom mijenjaju djelovanje antibiotika putem jednog od sljedećih mehanizama: (1) modifikacije antimikrobne mete (smanjenje afiniteta za lijek), (2) smanjenjem unosa lijeka, (3) aktiviranjem efluks mehanizama za istiskivanje štetnih molekula ili (4) globalnim promjenama u važnim metaboličkim putevima putem modulacije regulatornih mreža. Dakle, otpor koji nastaje uslijed stečenih mutacijskih promjena je raznolik i varira u složenosti (MUNITA i ARIAS, 2016.).

Horizontalni prijenos gena

Stjecanje stranog DNA materijala horizontalnim prijenosom gena jedan je od najvažnijih pokretača evolucije bakterija i često je odgovoran za razvoj antimikrobne rezistencije. Većina antimikrobnih sredstava koja se koriste u kliničkoj praksi su (ili potječu od) proizvoda koji se prirodno nalaze u okolišu. Kao što je već spomenuto, bakterije koje dijele okoliš s tim molekulama, nose unutranje genetske determinante rezistencije. Bakterije stječu vanjski genetski materijal kroz tri glavne strategije: (1) transformacija, (2) transdukcija i (3) konjugacija (KALENIĆ i sur., 2013.).

Transformacija je možda najjednostavniji tip horizontalnog prijenosa gena, ali samo mali broj klinički relevantnih bakterija može „prirodno“ inkorporirati golu DNA kako bi razvili otpornost (Munita i Aries, 2016). Transformacija je prijenos većih fragmenata DNA iz okoline u stanicu bakterije. Tu se DNA rekombinira s homolognim dijelom DNA domaćina. Ako uneseni dio DNA ne odgovara, dolazi do razgradnje endonukleazama. Prijenos DNA fragmenata transormacijom, u prirodnim uvjetima može teći samo između bakterija iste vrste, dok u laboratorijskim uvjetima može doći do uzimanja fragmenata DNA druge bakterijske vrste (KALENIĆ i sur., 2013.).

Transdukcija je prijenos DNA iz stanice donora u stanicu recipijenta pomoću bakterijskog virusa, bakteriofaga. Transdukcija ne zahtijeva fizički kontakt između stanice donora i stanice

primatelja, ali ovaj mehanizam zahtijeva da se bakteriofag replicira unutar stanice donora. Kada bakteriofag zarazi bakterijsku stanicu, koristi mehanizme reprodukcije stanice domaćina i na taj način proizvodi dijelove virusne čestice. Nakon formiranja cjelovitih faga, dolazi do lize bakterije domaćina, a oni se oslobađaju u okoliš u kojemu mogu zaraziti novu stanicu domaćina (NORMAN i sur., 2009.).

Konjugacija je prijenos DNA višestupanjskim procesom koji zahtijeva direktni kontakt između dvije bakterijske stanice preko pilusa i od svih mehanizama koji su uključeni u horizontalni prijenos gena, ovaj je daleko najviše istražen (GUGLIELMINI i sur., 2013.). Također, od svih mehanizama konjugacija se smatra najčešćim mehanizmom kojim se prenose mobilni genetski elementi koji nose gene rezistencije za određeni antibiotik, a razlog tome je što omogućava bolju zaštitu odvijanja mehanizma od utjecaja okoline i djelotvornije načine unošenja DNA u stanicu recipijenta od transformacije (NORMAN i sur., 2009.).

Naposljetku, jedan od najučinkovitijih mehanizama za prijenos gena antimikrobne rezistencije, predstavljaju integroni koji su specifični rekombinacijski sustavi koji omogućavaju bakterijama da se brzo prilagode i brzo evoluiraju kroz nagomilavanje i ekspresiju novih gena. Ti su geni ugrađeni u specifičnu genetsku strukturu koja se naziva genska kaseta (MUNITA i ARIAS, 2016.).

Antibiotic class	Resistance type	Resistance mechanism	Common example
Aminoglycoside	Decreased uptake	Changes in outer membrane	*P. aeruginosa*
	Enzymatic modification	AGE's	Gram-negative bacteria
Beta-lactams	Altered PBP	PBP 2a	Mec A in *S. aureus*, CONS, *S. pneumoniae*
	Enzymatic degradation	Penicillinase which are classified as per ambler classification	Gram-negative bacteria
Glycopeptides	Altered target	D-alanyl-alanine is changed to D-alanyl-D-lactate	Vancomycin resistance in *E. faecium* and *E. faecalis*
Macrolides	Altered target	Methylation of ribosomal active site with reduced binding	*erm*-encoded methylases *in S. aureus*, *S. pneumoniae*, and *S. pyogenes*
	Efflux pumps	Mef type pump	*S. pneumoniae* and *S. pyogenes*
Oxazolidinones	Altered target	Mutation leading to reduced binding to active site	*E. faecium* and *S. aureus*
Quinolones	Altered target	Mutation leading to reduced binding to active site(s)	Mutations in gyr A in enteric Gram-negative bacteria and *S. aureus*
	Efflux	Membrane transporters	Mutations in gyr A and par C in *S. pneumoniae*. Nor-A in *S. aureus*
Tetracyclines	Efflux	New membrane transporters	*tet* genes encoding efflux proteins in Gram-positive and Gram-negative bacteria
	Altered target	Production of proteins that bind to the ribosome and alter the conformation of the active site	*tet* (M) and *tet* (O) in Gram-positive and Gram-negative bacteria species
Chloramphenicol	Antibiotic inactivation	Chloramphenicol acetyl transferase	CAT in *S. pneumonia*
	Efflux pump	New membrane transporters	cml A gene and flo gene efflux in *E. coli*
Sulfa drugs	Altered target	Mutation of genes encoding DHPS	*E. coli*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*

DHPS=Dihydropteroate synthase, P. aeruginosa=Pseudomonas aeruginosa, S. aureus=Staphylococcus aureus, S. pneumoniae=Streptococcus pneumoniae, E. faecium=Enterococcus faecium, E. faecalis=Enterococcus faecalis, S. pyogenes=Streptococcus pyogenes, E. coli=Escherichia coli, PBP=Penicillin binding protein, AGE's=Aminoglycoside modifying enzymes, CAT=Chloramphinecol acetyl transferases

Tablica 1. Mehanizmi rezistencije pojedinih antibiotika (KAPOOR i sur., 2017.).

1.5.2. Mehanistička osnova antimikrobne rezistencije

Nije iznenađujuće da su bakterije razvile sofisticirane mehanizme otpornosti na lijekove kako bi izbjegli ubijanje antimikrobnim molekulama. To je proces koji se vjerojatno razvijao tijekom milijuna godina evolucije. Treba napomenuti da se rezistencija na jednu antimirobnu skupinu obično može postići višestrukim biokemijskim putevima, a jedna bakterijska stanica može biti sposobna koristiti niz mehanizama otpornosti da preživi učinak antibiotika. Primjerice, rezistencija na fluorokinolon javlja se kao posljedica triju različitih mehanizama, od kojih svi mogu postojati u istim bakterijama u određeno vrijeme (MUNITA i ARIAS, 2016.).

S druge strane, izgleda da su bakterijske vrste stvorile sklonost prema nekim mehanizmima rezistencije. Primjerice, dominantni mehanizam otpornosti na β-laktame u gram-negativnih bakterija je proizvodnja β-laktamaza, dok se otpornost na te spojeve u gram-pozitivnih bakterija uglavnom postiže modifikacijama njihovog ciljnog mjesta, proteina koji vežu penicilin (PBP). Tvrdilo se da je ovaj fenomen vjerojatno posljedica posljedica velikih razlika u omotaču stanica gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. U prvih, prisutnost vanjske membrane dopušta da se

kontrolira ulazak molekula u periplazmatski prostor. Suprotno tome, ta prednost ne postoji u gram-pozitivnih organizama (MUNITA i ARIAS, 2016.).

Sprječavanje antimikrobnog lijeka da dosegne ciljno mjesto smanjenjem njegove sposobnosti prodiranja u bakteriju

Antimikrobni spojevi gotovo uvijek zahtijevaju pristup u bakterijsku stanicu da dosegnu svoje ciljno mjesto gdje mogu ometati normalnu funkciju bakterijskog organizma. Porinski kanali su prolazi pomoću kojih bi ti antibiotici normalno prelazili bakterijsku vanjsku membranu. Neke se bakterije štite tako što zabranjuju ulazak antimikrobnih spojeva u stijenke njihovih stanica. Primjerice, mnoštvo gram-negativnih bakterija smanjuje unos određenih antibiotika, kao što su aminoglikozidi i β-laktami, modificiranjem frekvencije, veličine i selektivnosti porinskog kanala stanične membrane. Zabrana ulaska na ovaj način spriječit će te antimikrobne lijekove da dostignu željene ciljeve, a to su za aminoglikozide i β-laktame, ribosomi i proteini koji vežu penicilin. Ova strategija primijećena je u:

- *Pseudomonas aeruginosa,* npr. protiv imipenema
- *Enterobacter aerogenes* i *Klebsiella spp.* protiv imipenema
- mnogih gram-negativnih bakterija protiv aminoglikozida
- mnogih gram-negativnih bakterija protiv kinolona (KAPOOR i sur., 2017.).

Inaktivacija antimikrobnih agensa modifikacijom ili razgradnjom

Drugi način na koji se bakterije čuvaju je uništavanje aktivne komponente antimikrobnog agensa. Klasičan je primjer hidrolitičko deaktiviranje β-laktamskog prstena u penicilina cefalosporina pomoću enzima nazvanog beta laktamaza. Inaktivirana peniciloinska kiselina će tada biti neučinkovita u vezanju na PBP (eng. penicilin binding protein), čime se štiti proces sinteze stanične stijenke. Ova je strategija primijećena u:

- enterobakterija protiv kloramfenikola
- gram-negativne i gram-pozitivne bakterije protiv aminoglikozida (KAPOOR i sur., 2017.).

Izbacivanje antimikrobnih agensa iz stanice putem općih ili specifičnih pumpi efluksa

Da bi bili učinkoviti, antimikrobni agensi moraju također biti prisutni u dovoljno visokoj koncentraciji unutar bakterijske stanice. Neke bakterije posjeduju membranske proteine koji djeluju kao pumpa za izvoz ili efluks za određene antimikrobne lijekove, istisnuvši antibiotik iz stanice jednako brzo kao što može ući. To rezultira niskim unutarstaničnim koncentracijama koje su nedovoljne za izazivanje učinka. Neke efluks pumpe selektivno istiskuju specifične antibiotike kao što su makrolidi, linkozamidi, streptogramini i tetraciklini, dok drugi izbacuju mnoštvo strukturno različitih antiinfektivnih tvari različitim načinima djelovanja. Ova je strategija primijećena u:

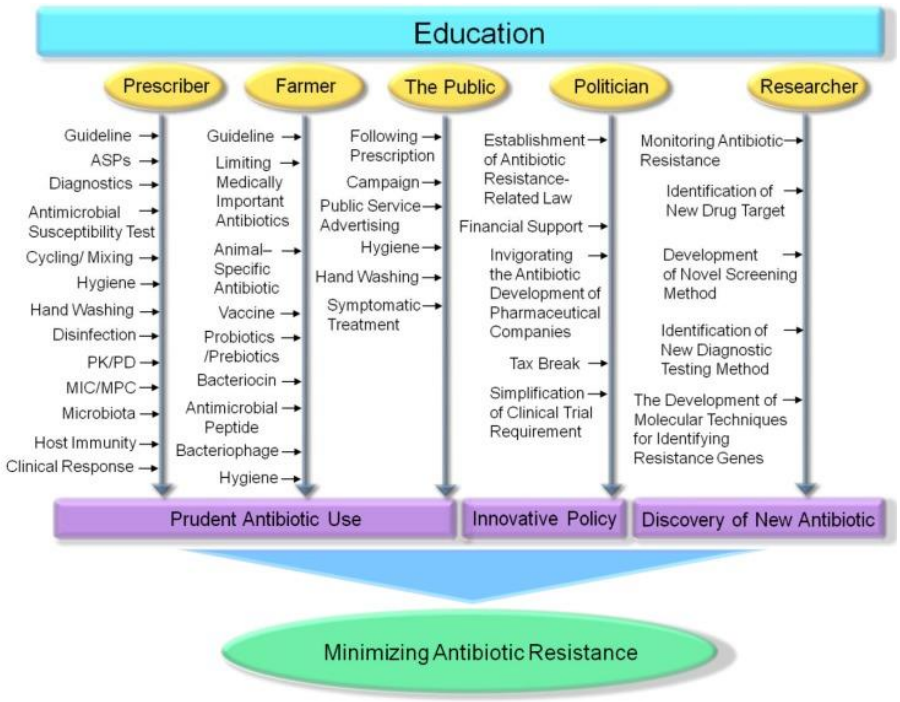
- *E. coli* i drugih *Enterobacteriaceae* protiv tetraciklina
- razni sojevi *Enterobacteriaceae* protiv kloramfenikola
- *Staphylococcus spp.* protiv makrolida i streptogramina
- *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae* protiv fluorokinolona (KAPOOR i sur., 2017.).

Modifikacija antimikrobnog ciljnog mjesta unutar bakterija

Neke rezistentne bakterije izbjegavaju antimikrobna sredstva reprogramiranjem ili kamufliranjem kritičnih ciljnih mjesta kako bi se izbjeglo prepoznavanje. Stoga, unatoč prisutnosti intaktnog i aktivnog antimikrobnog spoja, neće se dogoditi posljedično vezanje ili inhibicija. Ova je strategija primijećena u:

- *Staphylococcus spp.* protiv meticilina i drugih β-laktama (promjene različitih PBP-a koji ne vežu učinkovito β-laktame da inhibiraju sintezu stanične stijenke)
- gram-pozitivnih koka: metilaza otporna na eritromicin kodirana je erm genima i uzrokuje strukturne promjene rRNA koje sprječavaju vezanje makrolida i omogućuju nastavak sinteze bakterijskih proteina
- *Enterococcus spp.* protiv vankomicina (promjene u komponentama prekursora stanične stijenke za smanjenje vezanja vankomicina)
- *Mycobacterium spp.* protiv streptomicina

- sojevi *Enterobacteriaceae* s mutacijama u DNA girazi rezultiraju otpornošću na kinolone (KAPOOR i sur., 2017.).



Slika 4. Strategije za smanjenje antibiotske rezistencije (LEE i sur., 2013.).

1.6. Načini prijenosa rezistencije sa životinja na ljude

1.6.1. Prijenos rezistentnih sojeva bakterija hranom

Hrana koja potječe od životinja liječenih antibioticima ima veliko značenje u širenju rezistencije. Većina infekcija u ljudi uzrokovanih rezistentnim sojevima salmonela povezana je s konzumacijom proizvoda podrijetlom od svinja, peradi ili goveda. Perad je glavni izvor rezistentnih sojeva bakterija roda *Campylobacter*. Rezistentni sojevi bakterije *E.coli* i enterokoka prenose se proizvodima podrijetlom od svinja, peradi i goveda , ali glavni je izvor takvih sojeva ipak u ljudskoj populaciji. Kako bi se utvrdila povezanost između životinja kao izvora rezistentnih bakterija, hrane i ljudi rabe se različite metode poput praćenja epidemioloških čimbenika i laboratorijskih tehnika za tipizaciju izoliranih sojeva bakterija. Primjeri prijenosa rezistentnih

bakterija hranom su slučajevi zaraze salmonelom rezistentnom na tetraciklin. Sojevi izdvojeni iz ljudi i hrane bili su identični onima izdvojenima iz goveda liječenih tetraciklinom u hrani. Postoje i primjeri zaraze sojevima rezistentnim na kloramfenikol, nalidiksičnu kiselinu pa i multirezistentnim sojevima salmonela. Analiza podataka koje prikuplja epidemiološka služba dovela je do zaključka da se ljudi koji žive u neposrednoj blizi farmi češće inficiraju rezistentnim sojevima. Osobito su ugrožene osobe koje rade izravno sa životinjama. Stručnjaci nailaze na brojne probleme prilikom pokušaja dokazivanja veze infekcije između ljudi i životinja kao izvora rezistentnih bakterija, a to zahtijeva skupe postupke. (ŠEOL i sur., 2010.).

1.6.2. Prijenos gena za rezistenciju izravnim dodirom sa životinjama koje se uzgajaju za hranu

Zabilježeni su slučajevi prijenosa multirezistentnih sojeva bakterije *Salmonella typhymurium* s oboljelih životinja na osoblje u veterinarskim ustanovama i skloništima za životinje. Sve je više dokaza o tome da je kliconoštvo meticilin – rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* mnogo češće kod ljudi koji rade na svinjogojskim farmama nego u njihovih susjeda koji nemaju kontakta sa svinjama. Takvi su slučajevi opisani u Nizozemskoj i Danskoj gdje je iz svinja izdvojen soj ST398 MRSA koji se povezuje s bolničkim infekcijama ljudi. Do danas su sojevi MRSA izdvojeni iz goveda, konja, svinja, ovaca, peradi i životinja kućnih ljubimaca. U Nizozemskoj i Kanadi je dokazano da su klonovi bakterije *E. coli* izdvojeni iz radnika na farmama svinja genetski identični sojevima koji su izdvojeni iz svinja (ŠEOL i sur., 2010.).

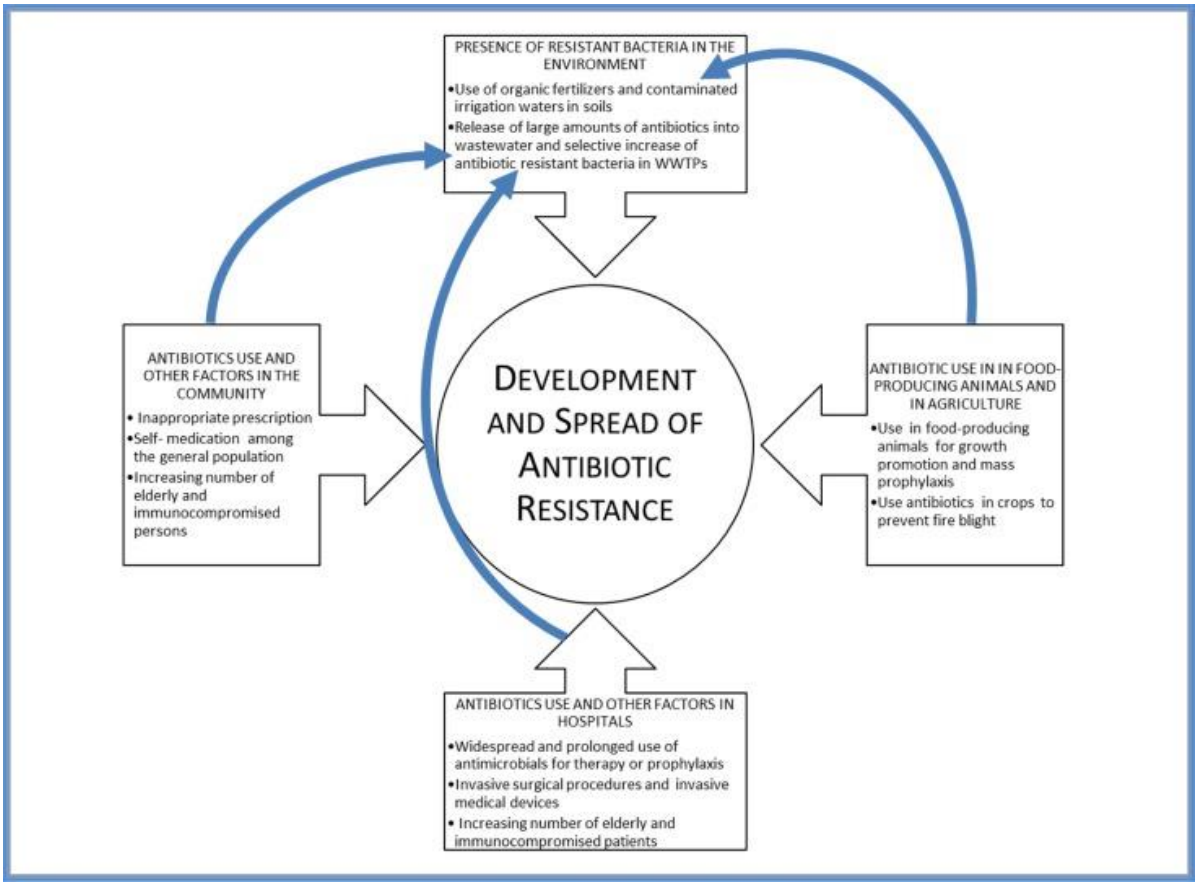
1.6.3. Prijenos gena za rezistenciju izravnim dodirom s kućnim ljubimcima

Unatoč činjenici da se slični antibiotici rabe za liječenje životinja koje se uzgajaju za proizvodnju hrane i kućnih ljubimaca, sve donedavno mogućnosti prijenosa rezistencije s kućnih ljubimaca na ljude nije se pridavao značaj. Praćenjem pojavnosti rezistentnih sojeva bakterija u kućnih ljubimaca dokazano je da, jedanko kao i životinje za proizvodnju hrane, i kućni ljubimci mogu biti rezervoari i prenositelji tih bakterija. Suživot ljudi i kućnih ljubimaca omogućava prijenos rezistentnih sojeva bakterija s kućnih ljubimaca na čovjeka. Također, postoji mogućnost

kontaminacije hrane sekretima i ekskretima životinja. Osobit problem u liječenju kućnih ljubimaca predstavlja upotreba antibiotika širokog spektra koji se nalaze na listi iznimno važnih antimikrobnih lijekova u humanoj medicini, npr. cefalosporina i fluorokinolona. Ti se antibiotici koriste puno češće u pasa nego u ljudi, a zbog širokog spektra djelovanja postoji vrlo velik pritisak na razvoj rezistentnih bakterija. Postoje dokazi o brojnim slučajevima zaraze ljudi salmonelama kontaktom s kliconošama ili oboljelim kućnim ljubimcima. Procjenjuje se da je 3-5% slučajeva salmoneloze ljudi uzrokovano sojevima podrijetlom iz egzotičnih kućnih ljubimaca. Štenad i mačke mogu biti nositelji sojeva bakterije *Campylobacter jejuni,* a najčešće se zaraze djeca. Pojavnost MRSA-e u kućnih ljubimaca je u stalnom porastu. Zabilježeni su slučajevi zaraze veterinara i vlasnika kućnih ljubimaca te je dokazano da su kućni ljubimci potencijalni izvor MRSA infekcije za ljude (ŠEOL i sur., 2010.).

1.6.4. Prijenos rezistencije u okolišu

Ovaj način prijenosa podrazumijeva prijenos rezistencije putem različitih sekreta i ekskreta životinja koji dospijevaju u okoliš te tako postaju izvorom infekcije za ljude. Izmet životinja koje su liječene antibioticima može biti izvor rezistentnih bakterija. Većina takvih bakterija ne može bez domaćina dugo preživjeti, ali mogu prenijeti gene za rezistenciju na bakterije koje žive u tlu. Na farmama i u njihovoj neposrednoj blizini moguć je prijenos rezistentnih bakterija zrakom. Postoje dokazi o izdvajanju sojeva MRSA-e u radnika koji su boravili na svinjogojskim farmama. Pritom treba razlikovati prolaznu kolonizaciju od trajnog kliconoštva. Dokazano je da nakon boravka na farmi dolazi do prolazne kolonizacije nosne sluznice sojevima MRSA-e. U manjem broju slučajeva dolazi do trajnog naseljavanja sojeva MRSA-e na sluznici nosne šupljine te takve osobe postaju kliconoše (ŠEOL i sur., 2010.).



Slika 5. Čimbenici uključeni u širenje antimikrobne rezistencije, u različitim sektorima: humana medicina u zajednici i bolnicama, životinjska proizvodnja i poljoprivreda te okoliš. Ti su sektori također međusobno povezani: zloupotreba antibiotika u ljudi, životinja i poljoprivredi je najodgovornija za prisutnost rezistentnih bakterija u okolišu (LEE i sur., 2013.).

2. NOVE STRATEGIJE U RAZVOJU ANTIMIKROBNIH LIJEKOVA

2.1. Alternativne strategije u borbi protiv bakterijskih infekcija

Naš dugoročni odnos s bakterijama započinje tijekom procesa rađanja i kulminira u ljudskom organizmu koji sadrži nekoliko puta više mikroba od ljudske stanice. Poremećaj u ravnoteži, zamjena interakcije između domaćina i mikroorganizama sa sinergije na infekciju rezultira oštećenjem tkiva domaćina i potrebom za terapeutskom intervencijom. (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

Budući da se antibiotski spojevi danas razvijaju znatno sporije nego evolucija bakterijske rezistencije, neophodne su alternativne strategije za borbu protiv zaraznih vrsta. Pristupi variraju od ciljanja specifičnih virulentnih sustava do manipuliranja fiziološkim aspektima bakterijskog načina života, kao što su komunikacija između stanica ili potreba za specifičnim faktorom za ekspresiju gena virulencije (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

Inhibiranje specifičnih faktora virulencije, tj. proteina odgovornih za patogenost, može biti put naprijed u otkrivanju novih antibiotika. Doista, barem u teoriji, antivirulentne terapije imaju brojne prednosti: (1) proizlaze iz detaljnog poznavanja mehanizama patogenosti, takvi antimikrobni lijekovi ciljaju posebno čimbenik virulencije, inhibirajući njegovo djelovanje na specifičan način, ostavljajući netaknutima sve druge bezopasne mikrobe; (2) rezistencija na takvu terapiju će se sigurno povećati, ali vjerojatno puno sporije, jer ciljani patogen ne može iskoristiti genetski bazen koji je lako dostupan (RUER i sur., 2015.).

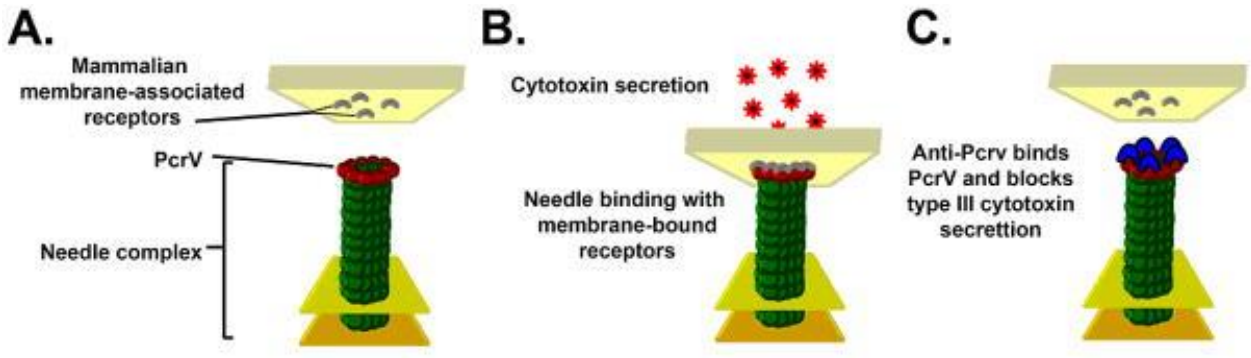
2.2. Pregled nekih od trenutnih pristupa koji se koriste za razvoj alternativnih antimikrobnih terapija

Jedan od pristupa za razvoj novih antimikrobnih spojeva je ciljanje specifičnih čimbenika virulencije koji su povezani s određenim bolesnim stanjem. Sustavi za izlučivanje i toksini pružaju idealne mete za nove terapije, a mnoga su se istraživanja usredotočila na razvoj tretmana za

neutralizaciju ili blokiranje tih specifičnih fizioloških čimbenika. Čimbenici virulencije bakterija obično su bjelančevine koje omogućuju adheziju, kolonizaciju ili invaziju bakterija. Nadalje, bakterije mogu onemogućiti ili umanjiti imunološki odgovor organizma ili izlučivati toksine. Čimbenici virulencije virusa određuju hoće li se bolest pojaviti te težinu same bolesti (CHEN, 2005.).

2.2.1. Zaštita putem inaktiviranja antitijela

Sustav za sekreciju tipa III koji se nalazi u mnogim patogenim vrstama je injekcijski sustav poput igle koji olakšava izlučivanje efektorskih molekula izravno u epitel sisavaca domaćina (Dacheux, 2004). Bakterijski efektori su proteini koje luče patogene bakterije u stanice domaćina, obično pomoću sustava za sekreciju tipa III (T3SS), sustava za sekreciju tipa IV (T4SS) ili sustava za sekreciju tipa VI (T6SS). Neke bakterije izlučuju samo nekoliko efektora u stanice domaćina, dok druge mogu ubrizgati na desetke ili čak stotine. Efektorski proteini mogu imati mnogo različitih aktivnosti, ali obično pomažu patogenu da napadne tkivo domaćina, potisne imunološki sustav ili na drugi način pomogne patogenu da preživi. Zasada su identificirana 4 efektorska proteina – ExoY, ExoS, ExoT i ExoU (HAUSER, 2009.). Ta 4 proteina imaju varijabilnu ekspresiju među različitim sojevima i izolatima *P. aeruginosa*, no gotovo svi sojevi izražavaju ExoU ili ExoS, rijetko oba (SHAVER i HAUSER, 2004.). Ovaj specifični sustav virulencije u kliničkim izolatima *Pseudomonas aeruginosa* snažno je povezan s akutnom upalom pluća i razvojem pneumonije u intubiranih pacijenata. Aktivna sekrecija citotoksina tipa III također cilja imunosne stanice domaćina, npr. makrofage i neutrofile, omogućavajući organizmima da izbjegnu imunološki odgovor i često smanjuju broj živih stanica obrane domaćina (DACHEUX, 2004.).



Slika 6. Tip 3 injekcijskog sustava bakterije *P. aeruginosa* **A.** uključuje kompleks nalik iglama koji prelazi bakterijski dvosloj, okrunjen proteinima PcrV na distalnom vrhu. **B.** vjeruje se da se vezanje igala događa preko interakcije s PcrV i olakšava ubrizgavanje citotoksina izravno u citoplazmu stanica sisavaca. **C.** Anti- PcrV antitijelo veže PcrV i blokira izlučivanje citotoksina (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2008.).

Injekcijski sustav tipa III sastoji se od više proteina koji usidre kompleks igala u bakterijskoj membrani i olakšavaju izlučivanje toksina. Npr. protein PcrV olakšava izlučivanje citotoksina iz *P. aeruginosa* i nalazi se na vrhu aparata za iglu (BROZ i sur., 2007). Vjeruje se da taj protein igra ulogu u vezivanju membranskih receptora sisavaca i bitan je za učinkovito izlučivanje citotoksina kod ove vrste (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.). PcrV ima jedinstvenu regulatornu ulogu u ekspresiji sustava tipa III bakterije *P. aeruginosa* i potreban je za translokaciju efektora. Zaštita od smrtonosne infekcije, ozljede pluća i stanične citotoksičnosti posredovana je antitijelima specifičnima za PcrV (SAWA i sur., 1999.). Novo antitijelo (anti PcrV) koje veže ovaj protein pokazuje izvrsnu učinkovitost u zaštiti akutno inficiranih miševa protiv epitelnog oštećenja posredovanog tipom III, vjerojatno blokiranjem vezanja kompleksa igala za staničnu membranu sisavaca prevenirajući efektorsku translokaciju (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.). Ovo antitijelo je humanizirano da bi se povećao njegov poluživot i smanjila imunogenost. Primjena ovog protutijela mogla bi omogućiti trostruki mehanizam zaštite: 1. prevenirajući akutnu ozljedu pluća; 2. reducirajući upalni odgovor koji također može doprinijeti oštećenju epitelnih stanica domaćina i 3. čuvajući aktivnost makrofaga i neutrofila. Održivi obrambeni sustav domaćina s većim brojem funkcionalnih imunosnih stanica omogićio bi bolje čišćenje kohabitirajućih vrsta, osobito patogenih, koje svojim kombiniranim djelovanjem

doprinose bolesnom stanju. Sličan pristup korišten je za razvoj protutijela protiv sekrecije tipa III bakterije *Yersinia pestis* (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

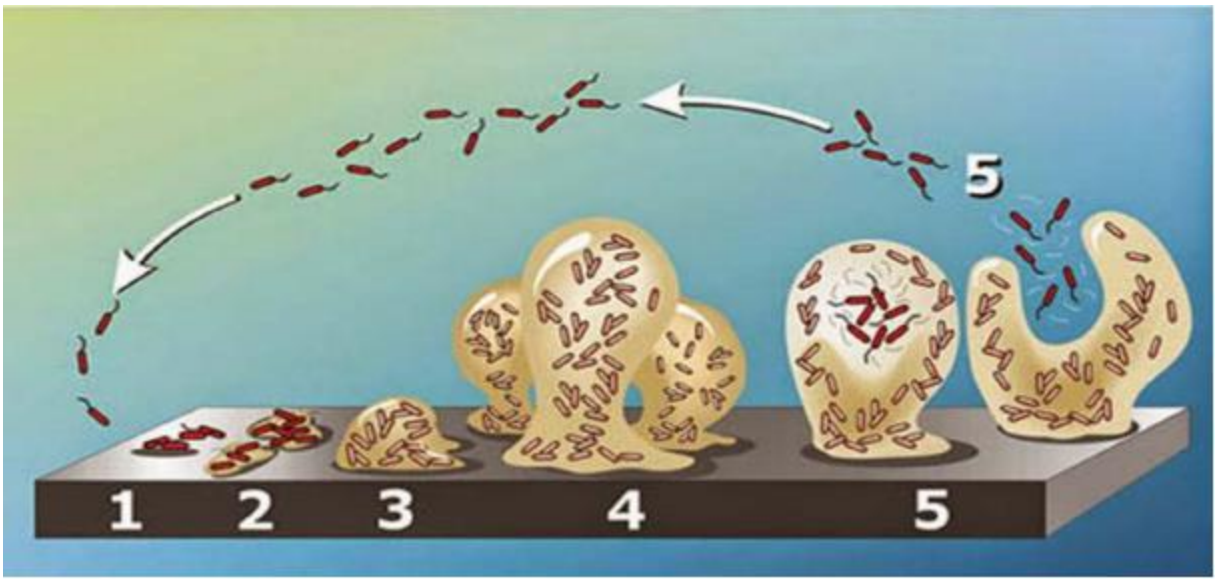
Drugi terapijski pripravci u razvoju, na bazi antitijela uključuju Valortim®, ljudsko monoklonsko antitijelo koje pokazuje profilaktičku i postinfekcijsku učinkovitost protiv toksina *B. anthracis*. Ovo antitijelo uspješno je završilo prvu fazu sigurnosne i farmakokinetičke procjene i brzo je praćeno od strane FDA kako bi se olakšalo brzo regulatorno razmatranje. Antivirulentno antitijelo, „BAT" (heptavalentni antitoksin botulizma) razvijeno je kako bi osiguralo zaštitu protiv 7 botulinum toksina (A, B, C, D, E, F i G). Ovo poboljšano antitijelo čija je djelotvornost procijenjena u studijama na životinjama, trenutno ima status „istraživanog lijeka" od strane FDA za studije na ljudima (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

2.2.2. Blokiranje vezivanja mikroorganizama

Dio tipičnog životnog ciklusa bakterija uključuje vezanje na površinu i formiranje biofilma (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.). Biofilm je specifična bakterijska formacija, konglomerat različitih bakterija u jednoj mini populaciji koje su udružene radi međusobne koristi i veće otpornosti na vanjska djelovanja (WU i sur., 2014.). Široko je definiran kao zajednica bakterijskih stanica zatvorenih u zaštitnom ekstracelularnom matriksu. Biofilm je sesilna zajednica mikroorganizama. Stanice u biofilmu su reverzibilno povezane sa supstratom i međusobno te uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile. Osim u biofilmu, mikroorganizmi mogu živjeti i slobodnim (planktonskim) načinom života. (BJARNSHOLT i sur., 2013.). Stvaranje biofilma je strategija preživljavanja bakterija i gljivica kako bi se prilagodile svom životnom okruženju, osobito u neprijateljskom okolišu. Pod zaštitom biofilma, stanice mikroorganizama u biofilmu postaju tolerantne i otporne na antibiotike i imunološke odgovore, što povećava poteškoće u kliničkom liječenju biofilmskih infekcija. Tipičan razvoj biofilma uključuje nekoliko faza – vezanje na površinu, formiranje mikrokolonija, razvoj mladog biofilma, diferencijaciju strukturiranog zrelog biofilma i raspršivanje zrelog biofilma (WU i sur., 2014.). Znanstvenici smatraju da antibiotici nisu najbolje rješenje u liječenju infekcija izazvanih ovom bakterijom jer većina antibiotika djeluje na planktonske stanice, a ne na biofilm. Stanice u biofilmu stječu gene za rezistenciju na antibiotike procesom konjugacije (BJARNSHOLT i sur., 2013.). U

ljudskom domaćinu, ovaj način bakterijskog života značajno doprinosi kroničnim infekcijama, kao što su kolonizacija dišnih puteva bolesnika s cističnom fibrozom i rekurentne infekcije mokraćnog sustava (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.). Eksperimentalni dokazi na *P. aeruginosa* in vitro i in vivo pokazali su da su biofilmske bakterijske stanice znatno otpornije na antibiotike i imunološku obranu domaćina od njihovih planktonskih dvojnika. Agresivno i intenzivno liječenje antibioticima obično pomaže u kontroli pogoršanja kroničnih biofilmskih infekcija i reducira biofilm, ali ne može iskorijeniti biofilmske infekcije, jer je teško in vivo postići minimalnu koncentraciju antibiotika za iskorjenjivanje zrelog biofilma. Dakle, jednom kada se ustanovi infekcija bakterijskim biofilmom, ona postaje teška za iskorijeniti. Budući da je bakterijski biofilm jako rezistentan na antibiotike i imunološki odogovor, antibiotskim tretmanima je gotovo nemoguće iskorijeniti biofilmske infekcije. Pokusi *in vitro* i *in vivo* pokazali su da je minimalna inhibicijska koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) za biofilmske infekcije obično mnogo viša (otprilike 10 do 1000 puta) nego za planktonske bakterijske stanice. Učinkovitu MBC antibiotika *in vivo* za eradikaciju biofilma nije moguće postići konvencionalnom primjenom antibiotika uslijed toksičnosti i nuspojava antibiotika i ograničenja bubrežnih i jetrenih funkcija (WU i sur., 2014.).

Početne faze formiranja biofilma uključuju vezanje bakterijske stanice na površinu stanice domaćina, što je posredovano adhezijskim proteinima. Blokiranje ovog početnog stupnja pričvršćivanja osigurava strategiju za sprječavanje kolonizacije epitelne površine. Nažalost, razne bakterijske vrste proizvode mnoštvo adhezijskih proteina, tako da nije vjerojatno da bi se mogla razviti zajednička anti-adhezijska terapija koja bi univerzalno blokirala vezanja bakterija za stanice domaćina. Međutim, čini se da neke patogene vrste kao što su *P. aeruginosa* i *Candida albicans* posjeduju adhezije koje imaju homologne domene za vezanje receptora. Ovaj je aspekt iskorišten za razvoj terapijskih sredstava koja su učinkovita protiv obje vrste paralelno. Druge anti-adhezijske terapije koje ciljaju vrsnospecifične adhezije, npr. one u uropatogene *E. coli,* također su u razvoju (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).



Slika 7. Shematski prikaz stvaranja biofilma. 1 Pričvršćivanje stanica na površinu. 2. Izlučivanje izvanstaničnih polimernih tvari te ireverzibilno pričvršćivanje bakterijskih stanica na površinu. 3. Početni razvoj ahitekture biofilma. 4. Sazrijevanje arhitekture biofilma. 5. Disperzija bakterijskih stanica iz zrelog biofilma (STOODLEY i sur., 2002.).

Liječenje infekcije biofilmom zahtijeva osjetljive i dobro penetrirajuće antibiotike kako bi se osigurala dovoljna koncentracija učinkovitog antibiotika na mjestu biofilmske infekcije. Općenito, makrolidi, linkozamidi, tetraciklini, rifamicini, kinoloni, nitroimidazol, sulfonamidi i oksazolidinoni bolje prodiru u tkiva i stanice nego beta-laktami (uključujući peniciline, cefalosporine i karbapeneme), aminoglikozidi, glikopeptidi i polimiksini. Prema karakteru antibiotske rezistencije te otpornosti u biofilmu u eksperimentalnim istraživanjima, predložene su visoke doze antibiotika u sigurnom rasponu funkcije bubrega i jetara. Osim toga, važno je i odgovarajuće trajanje liječenja antibioticima (WU i sur., 2014.).

Pili ili fimbrije, šuplji ekstracelularni bakterijski dodaci sastavljeni od oligomernih proteina pilina, također igraju važnu ulogu u početnom bakterijskom vezanju, vezivanjem receptora na površini stanica sisavaca domaćina. Pili su vrlo vjerojatno najvažniji adhezini koje *P. aeruginosa* posjeduje te su također važni za pokretljivost i formiranje biofilma. Pili dovode do agregacije bakterija i formiranja mikrokolonija na ciljnim tkivima te koncentriranja bakterija na jednom mjestu, čime se štite od imunosnog sustava domaćina i djelovanja antibiotika (CRAIG i sur., 2004.). I gram-pozitivne i gram-negativne bakterijske vrste stvaraju piluse, čineći ih atraktivnom

metom za nove terapeutike. Adhezini, kao što je lektin, obično se nalaze na pilusima i olakšavaju vezanje na oligosaharide na površini stanica sisavaca. Pristupi za sprječavanje početnog vezanja pilusa, uključuju blokiranje vezanja. Prirodni i sintetski derivati ugljikohidrata pokazali su djelotvornu aktivnost blokiranja pilusa u različitim testovima i predstavljaju održivu mogućnost za nove anti-adhezijske lijekove. Alternativni pristup je inhibicija formiranja pilusa blokiranjem aktivnosti sustava koji su potrebni za njihovu biogenezu. Pilicidi su u razvoju za brojne bakterijske vrste, uključujući *E.coli*. S obzirom na ključnu ulogu pilusa u početnoj adheziji i činjenicu da sustav chaperone-usher igra glavnu ulogu u biogenezi pilusa za brojne patogene vrste, polaže se nada da će pilicidi biti učinkoviti protiv više vrsta, pružajući širok raspon antibakterijskih terapijskih opcija (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

2.2.3. Identifikacija molekula koje pružaju zaštitu od specifičnih faktora virulencije

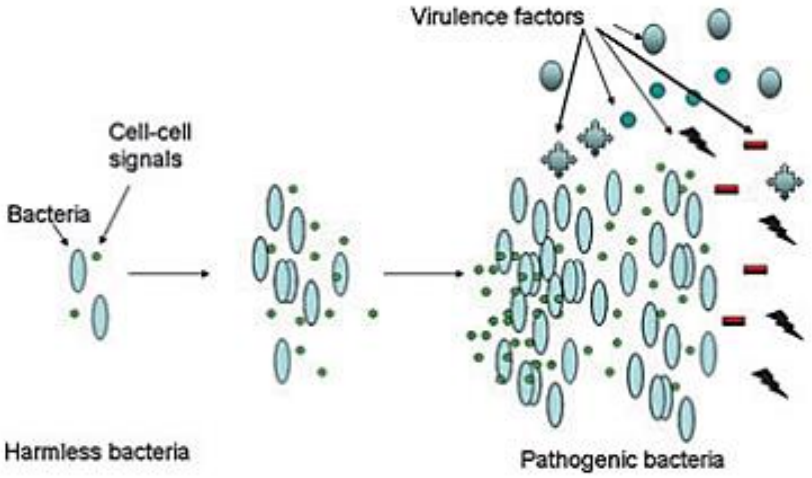
Nedavno istraživanje kojim se ispituje molekularna osnova načina na koji komenzalne vrste bakterija postaju patogene, prikazalo je inhibiciju ekspresije gena virulentnosti vrste *Shigella* pomoću kinolinata. Ovaj spoj proizveden od nadA i nadB gena vrste *Shigella* djeluje kao antivirulentni faktor koji inhibira invaziju blokiranjem sekrecije tipa III dvaju efektorskih proteina IpAB i IpaC koji su ključni za invaziju stanica sisavaca (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

Baza podataka prirodnih spojeva, malih sintetskih molekula i peptida dokazano je plodno područje za nove antimikrobne tvari. Do sada je baza podataka malih molekula dovela do identifikacije spoja virstatin, koji učinkovito inhibira ekspresiju gena toxT, faktor transkripcije koji aktivira ekspresiju toksina kolere i proizvodnju pilusa. U odvojenim studijama identificirani su spojevi (peptidi i male molekule) koji blokiraju antraks toksin inhibicijom enzimske aktivnosti, dok drugi blokiraju endosomalnu acidifikaciju – ključni korak u ulasku toksina u stanicu sisavca. U drugoj studiji, NORDFELTH i suradnici (2005) pregledali su bazu podataka o malim molekulama kako bi identificirali spoj koji bi inhibirao sekreciju tipa III pomoću *Yersinia pseudotuberculosis*. Ovaj je pristup doveo do identifikacije aciliranog hidrazona koji specifično blokira izlučivanje TTSS efektorskog proteina ove vrste (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

2.2.4. Inhibitori međustanične komunikacije

Bakterije su majstori iskonske osjetilne percepcije; ta je sposobnost olakšana putem međustanične komunikacije (engl. *quorum sensing*, od lat. *quorum* = određeni broj prisutnih članova potreban za donošenje nekog zaključka, engl. *sense* = osjetilo, osjet). Međustanična komunikacija je mehanizam kojim bakterije reguliraju ekspresiju gena u skladu s gustoćom populacije korištenjem signalnih molekula, kojim one komuniciraju i koordiniraju grupno ponašanje. Obično ih koriste patogene bakterije u procesima bolesti i infekcije. Standardni mehanizmi međustanične komunikacije sastoje se od bakterijske populacije, signalnih molekula i gena ponašanja (MILLER i BASSLER, 2001).

Međustaničnom komunikacijom bakterije procjenjuju gustoću svoje populacije tako što izlučuju spojeve slične hormonima, koje nazivamo autoinduktorima (SPERANDIO, 2009.) Bakterije izlučuju autoinduktore u okoliš i postupno povećavaju koncentraciju kako populacija bakterija raste. Nakon što dosegnu određenu koncentraciju, signalne molekule, tj. autoinduktori postaju prepoznatljivi za bakterijske populacije koje zatim aktiviraju odgovarajuće gene koji reguliraju različito ponašanje bakterija, kao što su virulencija, horizontalni prijenos gena i formiranje biofilma (MILLER i BASSLER, 2001.).



Slika 8. Mehanizam djelovanja quorum sensing-a (BJARNSHOLT, 2013.).

Međustanična komunikacija uključuje grupnu komunikaciju i sinkronizaciju ponašanja te je vrlo korisna za bakterije jer im omogućuje da se brže razvijaju, dobivaju više resursa i osiguravaju bolje izglede za preživljavanje. Patogene bakterije koji posjeduju ovaj način komunikacije također mogu inficirati organizam domaćina učinkovitije što dovodi do smrtonosnijih bolesti (MILLER i BASSLER, 2001.).

Kao posljedica toga, antimikrobna terapija često ne uspijeva iskorijeniti biofilm s mjesta infekcije. Zbog toga su potrebna inovativna sredstva protiv biofilma s novim ciljevima i načinima djelovanja. Jedan alternativni pristup je usmjeren na bakterijski komunikacijski sustav (BRACKMAN i COENYE, 2015.).

Sustavi međustanične komunikacije imaju tri ključne točke koje se mogu „napasti“: signalni generator (Luxl homolog), signalnu molekulu (AHL) i signalni receptor (LuxR homolog). Do sada je najmanje istražena strategija koja ometa proizvodnju AHL. Iako je otkriveno da nekoliko homolognih supstrata može blokirati AHL *in vitro,* niti jedan od njih nije testiran na bakterije *in vivo*. Druga strategija je inaktivacija ili potpuna degradacija generirane signalne molekule. To se može postići različitim metodama: kemijskom razgradnjom, enzimskom destrukcijom i metabolizmom AHL-a. Treći pristup koji ometa bakterijsku međustaničnu komunikaciju je sprječavanje primanja signala od bakterija, ili blokiranjem ili uništavanjem receptora proteina LuxR homologa (RASMUSSEN i GIVSKOV, 2006.).

Godine 1993. de Nys i suradnici izvijestili su da je morska alga, *Delisea pulchra,* proizvela niz halogeniranih furanona koji inhibiraju bakterijsku međustaničnu komunikaciju. Ovo je bilo prvo zabilježeno izvješće o inhibitorima te komunikacije. Napori da se kemijski modificiraju ovi spojevi kako bi se povećala njihova aktivnost protiv klinički relevantnih vrsta kao što je *P. aeruginosa,* rezultirali su identifikacijom dvaju spojeva C-56 i C-30 koji su pokazali učinkovitost u čišćenju ove vrste u miševa s kroničnom infekcijom. Drugi inhibitori međustanične komunikacije identificirani su u biljnim i gljivičnim namirnicama, a ti spojevi također pokazuju učinkovitost *in vivo* i *in vitro* kod infekcije u miševa (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2008.).

2.2.5. Strategija trojanskog konja

Još jedan obećavajući pristup u istraživanju antimikrobnih mehanizama usmjeren je na dostupnost željeza (Fe^{3+}) kao esencijalnog čimbenika virulencije bakterije *P. aeruginosa.* Ljudski imunološki odgovor ograničava dostupnost željeza (Fe^{3+}) u pokušaju ublažavanja virulencije infektivnih patogena. Međutim Fe^{3+} ima ključnu ulogu u mnogim klinički relevantnim patogenim vrstama te se u tim organizmima razvilo mnoštvo sustava za čišćenje Fe^{3+} iz okoliša. Nedavni rad skupine znanstvenika u Seattleu koristio je strategiju „trojanskog konja" kako bi prevario bakterijske stanice i smanjio unos željeza. Prijelazni metal galij (Ga^{3+}) kemijski je sličan željezu, ali za razliku od Fe^{3+} ne prolazi redoks reakcije i stoga je biološki neaktivan i nesposoban za obavljanje staničnih funkcija Fe^{3+} unutar bakterijske stanice (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

Prisustvo galija smanjuje unos Fe^{3+}, stoga potiskuje regulatore transkripcije ovisne o željezu, kao što su pvdS koji kontroliraju brojne faktore virulencije u *P. aeruginosa.* Dvije prednosti korištenja ovog pristupa u humanim domaćinima su da je galij već odobren za upotrebu u velikim koncentracijama od strane FDA i budući da Fe^{3+} zahtijeva mnoštvo klinički relevantnih patogena, vjerojatno je da će ovaj terapeutik biti učinkovit protiv koinfektivnih patogena u polimikrobnoj zajednici (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2010.).

2.3. Pitanje polimikrobnih zajednica

Jedno od ključnih pitanja kod razvoja vrsnospecifičnih terapija jest to da bakterijske vrste ne postoje izolirano u ljudskom domaćinu. Mikroorganizmi rijetko rastu kao jedna vrsta u prirodi. Umjesto toga, oni žive kao članovi velikih zajednica mikroorganizama u jedinstvenim nišama, poput biofilma. Te niše uključuju površine tijela i tjelesne šupljine kao što su nosna šupljina, usna šupljina, respiratorni, probavni i mokraćni sustav (HALL-STOODLEY, 2004.). Naša je percepcija infekcije dugo bila ograničena na pregršt primarnih patogenih mikroorganizama koji se javljaju izolirano u tim nišama. Nedavno istraživanje pedijatrijskih slučajeva cistične fibroze otkrilo je da se može identificirati 65 različitih bakterijskih vrsta u ispircima dišnih puteva. Nedavne analize mikrobioma probavnog sustava pokazale su prisutnost 395 bakterijskih filotipova, od kojih je 62%

predstavljalo nove rodove te da kod pojave mnogih bolesti probavnog sustava dolazi do promjena u sastavu mikrobioma. Ove i mnoge druge studije pokazale su kompleksnost mikrobioma i naglašava da bolest uzrokuje mješovita populacija mikroorganizama, a ne pojedinačna vrsta (LYNCH i WIENER-KRONISH, 2008.).

Bakterije posjeduju mnoštvo sustava za prijenos signala koji im omogućuje da osjete signale okoline i odgovarajuće reagiraju. U infektivnim stanjima, ovi signali mogu doći od imunosnog odgovora domaćina ili mikroorganizama koji zajedno obitavaju u istoj ekološkoj niši. Ovi uvidi nam sada omogućuju da razmotrimo terapijske pristupe koji blokiraju specifične čimbenike virulencije ili otupljuju sustave senzornog odgovora rezistentnih vrsta unutar polimikrobne zajednice koja sprječava oštećenje stanica domaćina (LYNCH I WIENER-KRONISH, 2008.).

S obzirom na to da su bakterijske vrste vješte u prepoznavanju i reagiranju na svoje okruženje, uključujući mikrobnu raznolikost, počinje se cijeniti kako specifični tretmani utječu na polimikrobnu zajednicu i te promjene u sastavu zajednice utječu na ponašanje primarnog patogena. Sveobuhvatno ispitivanje učinka novih terapeutika na raznolikost i funkciju zajednice mikroorganizama donijet će informacije o učincima tih tretmana i pružiti vrijedan uvid u nepredviđene nuspojave kao što je proliferacija patogena ili neočekivana indukcija specifičnih virulentnih sustava (LYNCH I WIENER-KRONISH, 2008.).

3. NEKONVENCIONALNI PRISTUPI U LIJEČENJU BAKTERIJSKIH BOLESTI

3.1. Antimikrobni peptidi

Antimikrobni peptidi (AMP) su dobili veliku pozornost kao nova skupina lijekova. To su peptidni antibiotici koje karakterizira amfipatska priroda izvedena iz njihovih pozitivnih naboja i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (AOKI i UEDA, 2013.).

Otkriće AMP-a datira iz 1939. godine, kada je Dubos ekstrahirao antimikrobni agens iz soja *Bacillus* u tlu. Pokazalo se da ovaj ekstrakt štiti miševe od infekcije pneumokokima. Sljedeće godine Hotchkiss i Dubos frakcionirali su ovaj ekstrakt i identificirali AMP koji je nazvan gramicidin. Unatoč nekim prijavljenim toksičnostima povezanim s intraperitonealnom primjenom, gramicidin je bio učinkovit za lokalno liječenje rana i ulkusa. Godine 1941. otkriven je još jedan AMP, tirocidin, za koji se ustanovilo da je učinkovit protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Prvi prijavljeni AMP životinjskog podrijetla je defenzin, koji je izoliran iz leukocita kunića 1956. godine (BAHAR i REN, 2013.).

Od izolacije prvih AMP-a, pokazalo se da djeluju kao bitna komponenta urođene imunosti protiv patogenih mikroorganizama i pronađeni su u raznim oblicima života, od mikroorganizama do ljudi (MAHLAPUU i sur., 2016.). Antimikrobni peptidi pokazuju iznenađujuće različite mehanizme djelovanja koji se razlikuju od onih u uobičajenih antibiotika. AMP-i ometaju strukturu membrane, inhibiraju sintezu proteina i DNA te potiskuju stanične procese, uključujući preklapanje proteina, sintezu stanične stijenke i metabolički promet. Zbog ovih različitih mehanizama djelovanja, AMP-i imaju snažno antimikrobno djelovanje u nanomolarnom ili mikromolarnom području protiv širokog spektra mikroorganizama, uključujući gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, gljivice i viruse. Osim toga, djelotvorni su i protiv patogenih organizama koji su otporni na konvencionalne lijekove. Stoga se AMP smatraju potencijalnim budućim antibioticima. Unatoč velikom potencijalu, AMP-i imaju nekoliko nedostataka koji ozbiljno ograničavaju njihovu kliničku upotrebu, uključujući hemolitičku aktivnost, široki spektar djelovanja, brz promet u ljudskom tijelu, deaktivaciju visokim koncentracijama soli te visoke troškove proizvodnje. Primjerice, AMP-i mogu izravno stupiti u interakciju sa stanicama domaćina

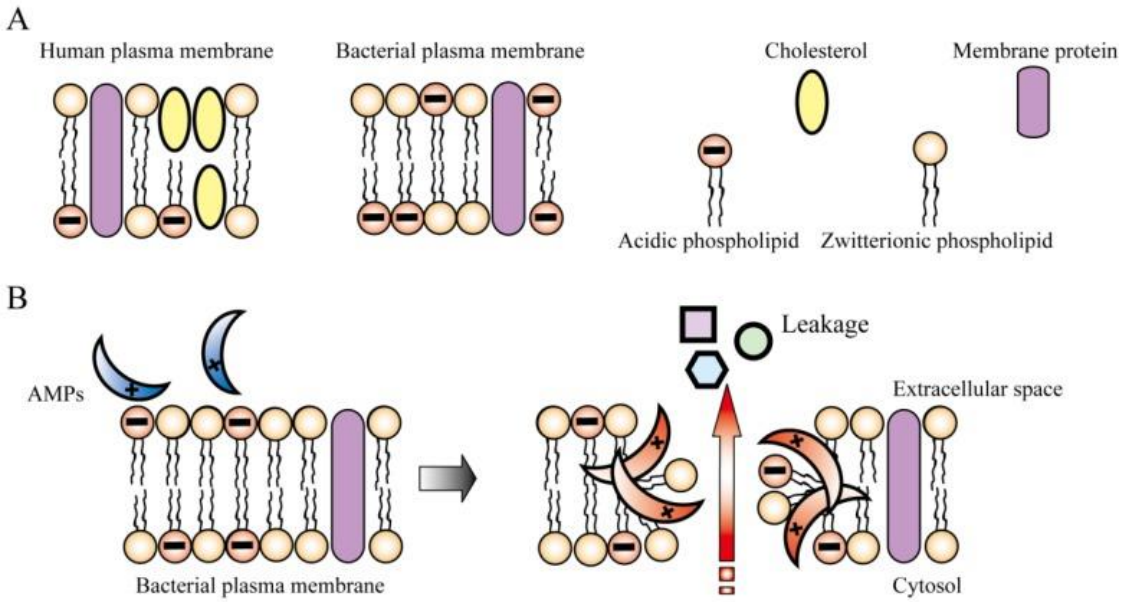
i lizirati ih. Nadalje, njihov široki spektar aktivnosti također može uzrokovati ozbiljne probleme. Primjena antibiotika širokog spektra može poremetiti autohtonu mikrofloru koja osigurava zaštitnu kolonizaciju protiv patogenih organizama, čime se povećava rizik od proljeva i drugih fatalnih infekcija. Svakako će biti potrebno poboljšanje navedenih nedostataka za kliničku upotrebu AMP-ova (AOKI i UEDA, 2013.).

3.1.1. Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida

Interakcija s bakterijskom membranom

Kationski AMP-ovi su amfipatski peptidi karakterizirani značajnim udjelom hidrofobnih aminokiselinskih ostataka i ukupnim pozitivnim nabojem (AOKI i UEDA, 2013.). AMP-i ubijaju stanice narušavanjem integriteta membrane (preko interakcije s negativno nabijenom staničnom membranom, inhibicijom proteina, sinteze DNA i RNA, ili interakcijom s određenim unutarstaničim metama (BAHAR i REN, 2013). Opće je prihvaćeno da je interakcija s membranom ključan čimbenik za izravnu antimikrobnu anktivnost AMP-a, kada se djeluje na samu membranu, ali i kada se djeluje na intacelularne komponente (MAHLAPUU i sur., 2016..).

Elektrostatske sile između kationskih AMP-a i negativno nabijene bakterijske površine, kritične su točke ove interakcije između peptida i bakterijske membrane. Citoplazmatske membrane gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija bogate su fosfolipidima, fosfatidilglicerolom i kardiolipinom koji imaju negativno nabijene glavne skupine, koje jako privlače pozitivno nabijene AMP-e (YEAMAN i YOUNT, 2003.).



Slika 9. Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida (AOKI i UEDA, 2013.).

Jedan od najbolje istraženih AMP-a je laktoferin. Laktofericin prirodno nastaje proteolizom laktoferina pepsinom u kiselim uvjetima. Laktofericin je bogat argininskim i hidrofobnim ostacima valina i triptofana te ima snažno antimikrobno djelovanje protiv patogena otpornih na višestruke lijekove, uključujući *S. aureus, A. baumanii* i *Candida albicans.* Laktofericin i drugi linearni AMP-i ometaju membrane bakterijske stanice drastično mijenjajući njihovu tercijarnu strukturu ovisno o okolini (AOKI i UEDA, 2013.). Nakon njihove interakcije s bakterijskom membranom, AMP-i spotano oligomeriziraju i tvore transmembranske pore koje uzrokuju propuštanje staničnog sadržaja.

Prekid stanične membrane i djelovanje na unutarstanične komponente

Kako bi došli do citoplazmatske membrane gram-negativnih bakterija, AMP-i prvo moraju proći kroz vanjsku membranu. Vanjska membrana čini permeabilnu barijeru za mnoge makromolekule (CLIFTON i sur., 2015.). U kontaktu s citoplazmatskom membranom, AMP-i tvore amfipatsku sekundarnu strukturu neophodnu za interakciju sa staničnom membranom (EBENHAN i sur, 2014.). Predloženo je nekoliko modela koji opisuju događaje na citoplazmatskoj

membrani, što u konačnici dovodi do povećane permeabilnosti membrane. Prema jednom od modela, peptidi se umetnu okomito u dvosloj što rezultira stvaranjem transmembranskih pora obloženih peptidima (MAHLAPUU i sur., 2016.). Permeabilizacija membrane dovodi do propuštanja iona i metabolita, depolarizacije transmembranskog potencijala s kasnijom disfunkcijom membrane. Osim što dovodi do disfunkcije membrane, permeabilizacija je važna za translokaciju određenih AMP-a u citoplazmu gdje djeluju na ključne stanične procese uključujući sintezu DNA i RNA te proteina, preklapanje proteina, enzimsku aktivnost i sintezu stanične stijenke (YEAMAN i YOUNT, 2003.). Važno je da, bez obzira na način djelovanja i ciljno mjesto, antibakterijska aktivnost AMP-a ovisi o interakciji s bakterijskom membranom (EBENHAN i sur., 2014.).

Imunomodulatorna aktivnost

Analiza dostupnih informacija o AMP-ima potvrdila je da nemaju veliki potencijal samo kao antibiotici, već i kao učinkoviti modulatori upale te djeluju tako da neutraliziraju bakterijske toksine. Imunomodulatorne aktivnosti koje provode AMP-i uključuju stimulaciju kemotaksije, diferencijaciju imunoloških stanica i pokretanje adaptivnog imuniteta (CLIFTON i sur., 2015.). Te aktivnosti nadalje uključuju supresiju proizvodnje upalnih citokina te anti-endotoksinske aktivnosti (MAHLAPUU i sur., 2016.).

3.1.2. Razvoj rezistencije na AMP-e

Ova višestruka strategija može biti učinkovita u povećanju antimikrobne učinkovitosti i izbjegavanju mogućih mehanizama otpornosti. Stjecanje rezistencije na AMP je vrlo rijetko, u usporedbi s konvencionalnim antibioticima, jer mikroorganizmi bivaju uništeni izravnim prekidom staničnih komponenti, uključujući membranu i DNA (AOKI i UEDA, 2013). Nadalje, djeluje se na više komponenata niskog afiniteta, tako da je bakterijama teže obraniti se pojedinačnim mehanizmom rezistencije (MAHLAPUU i sur., 2016.). Pojava rezistentnih sojeva AMP-a je manje vjerojatna jer je razvoj mikrobiološke rezistencije genskim mutacijama na takav

mikrobicidni mehanizam djelovanja težak, iako mikroorganizmi mogu u određenoj mjeri koordinirati protumjere za zaobilaženje napada AMP-a (AOKI i UEDA, 2013.).

3.1.3. Klasifikacija antimikrobnih peptida

Antivirusni peptidi

Antivirusni AMP-i neutraliziraju viruse integriranjem u virusnu ovojnicu ili staničnu membranu domaćina. AMP-i se mogu integrirati u virusne omotače i uzrokovati nestabilnost membrana, čineći viruse nesposobnima za infekciju stanica domaćina. Također, AMP-i mogu smanjiti vezanje virusa na stanice domaćina. Osim prekida virusnih omotača i blokiranja virusnih receptora, neki antivirusni AMP-i mogu spriječiti ulazak virusnih čestica u stanice domaćina zauzimanjem specifičnih receptora na stanicama sisavaca. U usporedbi s AMP-ima koji ciljaju viralne receptore na staničnoj površini, neki AMP-i umjesto toga mogu prijeći staničnu membranu i lokalizirati se u citoplazmi i organelama, uzrokujući promjene u profilu ekspresije gena stanica domaćina, što može pomoći obrambenom sustavu domaćina u borbi protiv virusa ili blokiranja ekspresije virusnih gena (BAHAR i REN, 2013.).

Antibakterijski peptidi

Antibakterijski peptidi su dosad najviše proučavani AMP-i, a većina njih su kationski AMP-i, koji ciljaju bakterijske stanične membrane i uzrokuju raspad strukture lipidnog dvosloja. Većina tih AMP-a je također amfipatska s obje hidrofilne i hidrofobne domene. Takva struktura osigurava im sposobnost vezanja na lipidne komponente i fosfolipidne skupine. Zanimljivo je da su istraživanja pokazala da AMP-i u niskim koncentracijama mogu ubiti bakterij ebez promjene integriteta membrane. Umjesto izravne interakcije s membranom, ti AMP-i ubijaju bakterije inhibiranjem nekih važnih puteva unutar stanice kao što je replikacija DNA i sinteza proteina. U nekim slučajevima pokazalo se da određeni AMP-i ubijaju bakterije otporne na antibiotike (BAHAR i REN, 2013.).

Antifungalni peptidi

Kao i antibakterijski, i antifungalni peptidi mogu ubiti gljivice ciljanjem ili stanične stijenke ili intracelularnih komponenti. Međutim, bakterijska membrana i stanična stijenka gljivica imaju različit sadržaj. Na primjer, hitin je jedna od glavnih komponenti stanične stijenke gljivica, a neki od antifungalnih peptida mogu se vezati na hitin. Takva sposobnost vezanja pomaže AMP-ima da učinkovito ciljaju gljivične stanice. Antifungalni AMP-i koji ciljaju staničnu stijenku ubijaju ciljne stanice narušavanjem integriteta membrane gljivica, povećanjem permeabilnosti plazmatske membrane ili izravnim formiranjem pora (BAHAR i REN, 2013.).

Antiparazitski peptidi

Antiparazitski peptidi su manja skupina u usporedbi s ostalim trima skupinama AMP-a. Prvi antiparazitski peptid je megainin, koji može ubiti *Paramecium caudatum.* Kasnije je razvijen sintetski peptid protiv parazita *Leishmania.* Drugi primjer antiparazitskog peptida je katelicidin, koji može ubiti *Caernohabditis elegans* formiranjem pora u staničnoj membrani. Iako su neki parazitski mikroorganizmi višestanični, način djelovanja antiparazitskih peptida je isti kao i ostali AMP-i. Oni ubijaju stanice izravnom interkacijom sa staničnom membranom (BAHAR i REN, 2013.).

3.2. Bakteriofagi

Fagi su virusi koji inficiraju bakterije i to je najistaknutiji oblik života na planeti. Koristili su se kao antibiotici prije nego je penicilin otkriven. Postoje mnoge vrste faga, ali uobičajeni pristup za bakterijsku terapiju čine litički fagi, koji uzrokuju lizu, a time i smrt bakterijske stanice. Fagi se vežu za bakterije, ubrizgaju svoju DNA ili RNA i koriste enzime domaćina za umnažanje (BAKER i sur., 2018). Drugi način djelovanja uključuje genetski modificirane fage, osobito filamentozne, koji ne uzrokuju lizu stanica i ne mogu se izravno koristiti za terapiju (PARISIEN i sur., 2007.). Prema tome, dva su životna ciklusa faga-litički i lizogeni. Litički fagi preuzimaju mehanizme stanice kako bi stvorili vlastite komponente, zatim uništavaju stanicu oslobađajući

nove čestice faga. Lizogeni fagi ugrađuju svoju nukleinsku kiselinu u kromosom stanice domaćina i umnažaju se s njom kao jedinica bez uništavanja stanice (NILSSON, 2014.).

Glavna prednost bakteriofaga, kao alternative antibioticima jest njihova specifičnost. Bakteriofagi specifično djeluju na patogenu bakteriju bez utjecaja na fiziološku mikrofloru domaćina, što smanjuje rizik od sekundarnih infekcija koje su često povezane s liječenjem antibioticima (NILSSON, 2014.). Također, prednost korištenja faga u terapiji je ta što se veliki broj faga može primijeniti u vrlo maloj dozi i bakterije koje uzrokuju infekciju će se umnažati i proizvesti više faga in situ (BAKER i sur., 2018.). Terapija fagima mogla bi biti učinkovitija jer se fagi umnažaju u stanici domaćina dokle god je specifičan domaćin prisutan, dok se antibiotici izlučuju ili im se smanjuje koncentracija. Nakon što je infekcija izliječena, fagi se razgrađuju, dok antibiotici mogu još dugo vremena opstati u prirodi. Nadalje, fagi su jednako učinkoviti u ubijanju osjetljivih, kao i rezistentnih bakterija. Iako terapija fagima ima brojne prednosti, njihova je specifičnost ujedno i njihovo glavno ograničenje (NILSSON, 2014.). Jedan bakteriofag će djelovati na samo ograničeni broj bakterijskih sojeva, što znači da su potrebni višestruki različiti fagi za liječenje jedne vrste. S obzirom na nedostatak brze i visokospecifične dijagnostike, vrlo veliki broj faga bi bio potreban kako bi se pokrile sve potencijalne vrste bakterija koje su uključene u infekciju (BAKER i sur., 2018.). Terapija fagima vjerojatno neće nikako potpuno zamijeniti konvencionalne antibiotike, ali bi mogla služiti kao dodatna mogućnost u terapiji određenih infekcija (NILSSON, 2014.).

3.3. Imunomodulacija

Osim sredstava koja djeluju na bakterije ili bakterijske proizvode, istraživanja su usmjerena prema poboljšanju imunološkog odgovora domaćina u borbi protiv infekcije (BAKER i sur., 2018). Imunomodulatorni lijekovi mijenjaju odgovor imunološkog sustava povećanjem ili smanjenjem produkcije serumskih protutijela. Imunostimulatori se propisuju kako bi se pojačao imunološki odgovor protiv infektivnih bolesti. Imunosupresivni lijekovi koriste se za smanjenje aktivnosti imunološkog sustava (BASCONES-MARTINEZ i sur., 2013.).

Imunomodulatori djeluju na različitim razinama imunološkog sustava. Stoga su razvijene različite vrste lijekova koji selektivno ili inhibiraju ili pojačavaju specifične populacije i subpopulacije imunoloških stanica, tj. limfocita, makrofaga, neutrofila, prirodnih stanica ubojica (NK) i citotoksičnih T-limfocita (CTL). Imunomodulatori utječu na stanice koje proizvode topljive medijatore kao što su citokini. Imunomodulatori specifičnog djelovanja utječu na imunološki sustav stanica prema prisutnosti određenog antigena ili imunogena. Imunomodulatori nespecifičnog djelovanja koriste se za stimuliranje ili suzbijanje imunog odgovora, bez usmjeravanja aktivnosti stimuliranih stanica na specifični antigen (BASCONES-MARTINEZ, 2013.). Imunomodulacija nudi veliki potencijal, ali će vjerojatno trebati dugo vremena da se ostvari njihov puni potencijal budući da nema ciljne mete za bakterijske infekcije (BAKER i sur., 2018.).

Citokini su, pored antitijela, jedan od najvažnijih sekreta stanice. To su proteini koji imaju specifičan učinak na interakciju i komunikaciju između stanica (ZHANG i AN, 2007.). Izlučuju ih brojne stanice u organizmu kao odgovor na određeni položaj. Mogu djelovati lokalno, uglavnom na druge stanice, a ponekad djeluju i na stanice koje ih izlučuju. Postoji nekoliko vrsta citokina: limfokini, monokini, kemokini i interleukini (ZHANG i AN, 2007.). Citokini i kemokini reguliraju imunološke odgovore putem signaliziranja preko membranskih receptora, čiji se signalni putevi mogu izbjeći ili oponašati virusima (ORTUÑO-SAHAGÚN i sur., 2017.).

Monoklonska protutijela (mAb) su monospecifična antitijela koja imaju sposobnost vezanja na isti epitop antigena i su nastala iz pojedinačnog klona B-limfocita, tj. plazma stanice (TABLL, 2015.). Monoklonska protutijela, proizvedena in vitro, prepoznaju specifične ciljne antigene; koriste se u liječenju solidnih i hematopoetskih tumora kao i upalnih bolesti. S obzirom da antitijela mogu biti usmjerena na bakterije, nije iznenađujuće da je primijenjen značajan napor kako bi se razvila terapija antitijelima kao alternativa antibioticima. Ključni izazov u liječenju bakterijske infekcije antitijelima jest taj da antitijela imaju ograničeni spektar i ciljaju samo mali broj sojeva određene vrste, a antitijelo koje bi služilo kao antibiotik mora biti sposobno ciljati veliki raspon bakterija. Nova tehnologija omogućila je istraživačima da modificiraju antitijela kako bi se povećala sposobnost jednog antitijela da veže dvije mete i da smanji ukupan broj mAb potreban za liječenje infekcije. Drugi pristup podrazumijeva ciljanje čimbenika virulencije koje bakterije proizvode, tako da više nisu patogeni za domaćina. Ovaj pristup se trenutno suočava s

određenim izazovima, kao što su provođenje kliničkih ispitivanja koja su uglavnom usmjerena na liječenje specifičnog patogena te troškovi proizvodnje mAb. S obzirom da tehnologija brzo napreduje, to bi moglo biti područje značajnog rasta u budućnosti. Od svih dosada opisanih pristupa, mAb vjerojatno imaju najbolju priliku za uspješno liječenje antimikrobne rezistencije (BAKER i sur., 2018.).

MOGUĆE ALTERNATIVE	MEHANIZAM DJELOVANJA	VJEROJATNI SPEKTAR AKTIVNOSTI I PRIMJENA
Protutijela	Vežu se na patogen, njegove virulentne faktore ili toksine i inaktiviraju ih.	Liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Moguća uporaba kao adjuvansa.
Probiotici	Probiotici su živi organizmi koji, kada se daju u ispravnoj količini, doprinose zdravlju domaćina.	Sprječavanje ili liječenje dijareje uzrokovane antibioticima i bakterijom *Clostridium difficile*.
Lizini	Lizini faga su enzimi koje koriste bakteriofagi kako bi uništili staničnu stijenku bakterija te se mogu koristiti kao zamjena antibioticima jer imaju direktnu antibakterijsku aktivnost. Mogli bi imati ulogu i kao adjuvantna terapija jer smanjuju bakterijsku barijeru i oslabljuju biofilm.	Liječenje infekcija Gram-pozitivnim bakterijama.
Divlji tip bakteriofaga	Divlji tip bakteriofaga inficira i ubija bakteriju. U stanici domaćina se umnaža te bi se stoga mogao koristiti u malim dozama.	Liječenje Gram-pozitivnih i Gram-negativnih infekcija.
Modificirani bakteriofag	Modificirani bakteriofag dobiva se genetičkim inženjeringom i ima poboljšana terapeutska svojstva u odnosu na divlji tip. Genetičkim inženjeringom mogli bi se spriječiti mnogi problemi divljeg tipa kao što su razvoj rezistencije, brza eliminacija nakon sistemske primjene i širina pokrivenosti soja.	Liječenje Gram-pozitivnih i Gram-negativnih infekcija.
Imunosna stimulacija	Imunosna stimulacija predložena je kao dodatna terapija antibioticima. Koristili bi se fenilbutirat i vitamin D kako bi se poticalo stvaranje urođenih antimikrobnih peptida.	Prevencija ili adjuvantna terapija za Gram-pozitivne i Gram-negativne infekcije.
Cjepiva	Ulaganje u nova cjepiva trebalo bi smanjiti incidenciju bakterijskih infekcija te samim time i uporabu antibiotika. Također nam je potrebno više znanja o potrebi cijepljenja starijih i imunokompromitiranih pacijenata.	Prevencija, više Gram-pozitivnih nego Gram-negativnih infekcija.
Antimikrobni peptidi	Prednosti: širok spektar aktivnosti koji uključuje većinu Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, baktericidno djelovanje, niska stopa rezistencije i slaba imunogeničnost. Potrebno je provesti još studija kako bi se otkrili razlozi zbog kojih se ne primjenjuju sistemski.	Liječenje ili adjuvantna terapija kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih infekcija.
Obrambeni peptidi domaćina i urođeni obrambeni peptidi	Imaju indirektan antimikrobni učinak. Uzrokuju povećanje ekspresije protuupalnih kemokina i citokina i smanjuju ekspresiju proupalnih citokina. Ciljanje odgovora domaćina moglo bi uzrokovati povećanu incidenciju nuspojava te otežati razlikovanje i razumijevanje imunoloških razlika između glodavaca i ljudi na razini populacije.	Dodatna terapija za Gram-pozitivne i Gram-negativne infekcije.
Antibiofilm peptidi	Specifično inhibiraju bakterijski biofilm. Nalaze se u pretkliničkim istraživanjima.	Dodatna terapija za Gram-pozitivne i Gram-negativne infekcije.

Tablica 2. Alternativni pristupi u liječenju bakterijskih infekcija (CZAPLEWSKI i sur., 2016.).

Postoji nekoliko razloga za razmatranje cjepiva kao najperspektivnije preventivne metode za rješavanje pitanja antimikrobne rezistencije. Prvo, cjepiva mogu izravno spriječiti infekcije uzrokovane razornim rezistentnim mikroorganizmima. Osim toga, indirektno smanjuju upotrebu antibiotika smanjenjem simptoma koji obično uzrokuju upotrebu antibiotika. Konačno, upotreba cjepiva sprječava proliferaciju bakterija koje ne dosežu visoki broj potreban za uspostavu rezistentnih mutacija. Postojeća cjepiva već mogu spriječiti infekcije uzrokovane nekim rezistentnim bakterijama kao što su *S. pneumoniae* i *H. influenzae.* Osim toga, još je mnogo cjepiva u kliničkoj razvojnoj fazi koja imaju potencijal spriječiti infekcije uzrokovane rezistentnim bakterijama (BAKER i sur., 2018.).

Alternative koje bi mogle imati najveći potencijal u liječenju bakterijskih infekcija su cjepiva i protutijela u profilaktičke svrhe, litički bakteriofagi u terapeutske svrhe te probiotici u profilaktičke ili terapeutske svrhe (CZAPLEWSKI i sur., 2016.).

4. Zaključak

Brzi porast antimikrobne rezistencije postaje sve veći globalni problem i na taj način smanjuje terapijske mogućnosti dostupne za mnoštvo patogenih mikroorganizama koje inficiraju organizam domaćina. U nastojanjima da se antimikrobna rezistencija smanji što je više moguće, potrebno je ispitati razvojno područje alternativnih terapija koje se bore protiv specifičnih bakterijskih sustava virulencije.

Razvoj terapije koja cilja specifične aspekte bakterijske fiziologije, predstavlja obećavajući pristup u borbi protiv patogenih vrsta Sve veće mjesto u istraživanjima zauzimaju antimikrobni peptidi, kao i bakteriofagi, kako za topikalno liječenje, tako i za liječenje sistemskih infekcija. U veterinarskoj medicini se trenutno koristi nekoliko drugih alternativa antibioticima, kao što su prebiotici i probiotici. Osim toga, nova znanja o mehanizmima bakterijske međustanične komunikacije o okolini unutar organizma domaćina također vode do razvoja potencijalnih novih pristupa u borbi protiv bakterijskih infekcija. Neki već postojeći antibiotici ometaju taj mehanizam, no uz to se istražuju i razvijaju nove tvari koje bi ciljano djelovale na isti. Najznačajniji uspjeh kao moguća alternativa antibioticima imala su cjepiva, ali ona se daju samo u profilaktičke svrhe. Uspješna antimikrobna terapija ovisi i o prikladnom imunosnom odgovoru, stoga je imunosna stimulacija predložena kao dodatna terapija uz davanje konvencionalnih antibiotika. Problemi koji su se javljali uz ovu terapiju uključivali su velik broj nuspojava, polimorfizme unutar populacije i varijabilne terapijske odgovore.

Poznato je da veterinarska medicina doprinosi nastanku i širenju antimikrobne rezistencije u ljudi. Glavna teza predložena u ovom radu jest ta da su hitno potrebni novi antimikrobni lijekovi kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini. U konačnici, razumijevanje fiziologije bakterija na razini pojedinačne vrste i na razini bakterijske populacije različitih vrsta, osigurat će daljnje terapijske mogućnosti.

5. LITERATURA

1. AMINOV, R. I. (2010): A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. Frontiers in Microbiology, 1.
2. AOKI, W., M. UEDA (2013): Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. Pharmaceuticals, 6(8), 1055–1081.
3. BAHAR, A., D. REN (2013): Antimicrobial Peptides. Pharmaceuticals, 6(12), 1543–1575.
4. BAKER, S. J., D. J. PAYNE, R. RAPPUOLI., E. DE GREGORIO (2018): Technologies to address antimicrobial resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(51), 12887–12895.
5. BASCONES-MARTINEZ, A., R. MATTILA, R. GOMEZ-FONT, J. MEURMAN (2014): Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal, 19(1), 24–31.
6. BHATTACHARJEE M. K. (2016): Chemistry of Antibiotics and Related Drugs. Basel, Springer.
7. BJARNSHOLT, T., O. CIOFU, S. MOLIN, M. GIVSKOV, N. HØIBY (2013): Applying insights from biofilm biology to drug development — can a new approach be developed? Nature Reviews Drug Discovery, 12(10), 791–808.
8. BRACKMAN, G., T. COENYE (2015): Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. 21(1), 5-11.
9. BROZ, P., C. A. MUELLER, S. A. MÜLLER, A. PHILIPPSEN, I. SORG, A. ENGEL, G. R. CORNELIS (2007): Function and molecular architecture of the Yersinia injectisome tip complex. Molecular Microbiology, 65(5), 1311–1320.
10. BUSHAK, L., (2016): A Brief History Of Antibiotic Resistance: How A Medical Miracle Turned Into The Biggest Public Health Danger Of Our Time. Medical Daily
11. CHEN, L. (2004): VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Research, 33(8), 325–328.
12. CHOPRA, I., M. ROBERTS (2001): Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(2), 232–260.

13. CHOPRA I., L. HESSE, A. O'NEILL (2002): Discovery and development of new antibacterial drugs, in Pharmacochemistry Library,. vol 32, Trends in Drug Research III, ed. van der Goot H., e Amsterdam: Elsevier, 213–225
14. CLIFTON, L. A., M. W. A. SKODA, A. P. LE BRUN, F. CIESIELSKI, I. KUZMENKO, S. A. HOLT, J. H. LAKEY (2014): Effect of Divalent Cation Removal on the Structure of Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Models. Langmuir, 31(1), 404–412.
15. COATES, A. R., G. HALLS, Y. HU (2011): Novel classes of antibiotics or more of the same? British Journal of Pharmacology, 163(1), 184–194.
16. COOPER G. M., R. E. HAUSMAN (2010): Stanica - molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, str. 571-572.
17. CRAIG L, M. E. PIQUE, J. A. TAINER (2004): Type 4 pilus structure and bacterial pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2: 363–378
18. CZAPLEWSKI, L., R. BAX, M. CLOKIE, M. DAWSON, H. FAIRHEAD, H. FISCHETTI, V. A., …J. H. REX (2016): Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. The Lancet Infectious Diseases, 16(2), 239–251.
19. DACHEUX, D. (2004): Pseudomonas aeruginosa Cystic Fibrosis Isolates Induce Rapid, Type III Secretion-Dependent, but ExoU-Independent, Oncosis of Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils. American Society for Microbiology, 68(5), 2916-2924.
20. DENYER S. P., N. A. HODGES, S. P. GERMAN (2004): Introduction to pharmaceutical microbiology. In: Denyer SP, Hodges NA & German SP (eds.) Hugo and Russell‟s Pharmaceutical Microbiology. 7th Ed. Blackwell Science, UK. 3-8.
21. DRAWZ, S. M., R. A. BONOMO (2010): Three Decades of -Lactamase Inhibitors. Clinical Microbiology Reviews, 23(1), 160–201.
22. EBENHAN, T., O. GHEYSENS, H. G. KRUGER, J. R. ZEEVAART, M. M. SATHEKGE (2014): Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging. BioMed Research International, 2014, 1–15.
23. FAIR, R. J., Y. TOR (2014): Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. Perspectives in Medicinal Chemistry, 6,
24. GUGLIELMINI, J., F. DE LA CRUZ, E. P. C. ROCHA (2012): Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. Molecular Biology and Evolution, 30(2), 315–331.

25. HALL-STOODLEY, L., J. W. COSTERTON, P. STOODLEY (2004): Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology, 2(2), 95–108.
26. HAUSER, A. R. (2009): The type 3 secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. Nat Rev Microbiol 7: 654–665
27. KALENIĆ S., I. FRANCETIĆ, M. GUBINA, M. HUKIĆ, I. KUZMAN (2013): Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada.
28. KAPOOR G., S. SAIGAL, A. ELONGAVAN (2017): Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology, 33(3), 300-305.
29. KATZUNG B. G., S. B. MASTERS, A. J. TREVOR (2011): Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, (1212), 774-898.
30. KARAMAN, R., S. JUMAA, (2015): Commonly Used Drugs - Uses, Side Effects, Bioavailability and Approaches to Improve it. Nova Science Publishers, 41-73
31. LEE, C.-R., I. CHO, B. JEONG, S. LEE, (2013): Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. International Journal of Environmental Research and Public Health, 10(9), 4274–4305.
32. LIOYD, N. C., H. W. MORGAN, B. K. NICHOLSON, R. S. RONIMUS (2005): The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. Angewandte Chemie International Edition, 44(6), 941-944.
33. LYNCH S. V., J. P. WIENER-KRONISH (2008): Novel Strategies to Combat Bacterial Virulence, 14(5): 593-599
34. MAHLAPUU, M., J. HÅKANSSON, L. RINGSTAD, C. BJÖRN (2016): Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 6.
35. MILLER, M. B., B. L. BASSLER (2001): Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review of Microbiology, 55(1), 165–199.
36. MUNITA, J. M., C. A. ARIAS (2016): Mechanisms of Antibiotic Resistance. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition, 481–511.
37. NILSSON, A. S. (2014): Phage therapy—constraints and possibilities. Upsala Journal of Medical Sciences, 119(2), 192–198.

38. NORDFELTH, R., A. M. KAUPPI, H. A. NORBERG, H. WOLF-WATZ, M. ELOFSSON (2005): Small-Molecule Inhibitors Specifically Targeting Type III Secretion. Infection and Immunity, 73(5), 3104–3114.
39. NORMAN, A., L. H. HANSEN, S. J. SORENSEN (2009): Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 364(1527), 2275–2289.
40. ORTUÑO-SAHAGÚN, D., K. ZÄNKER, A. K. S. RAWAT, S. V. KAVERI, P. HEGDE (2017): Natural Immunomodulators. Journal of Immunology Research, 2017, 1–2.
41. PAPICH, M. G. (2011.): Saunders handbook of veterinary drugs: Small and large animals, third edition, (896) 739-741
42. PARISIEN, A., B. ALLAIN, J. ZHANG, R. MANDEVILLE, C. Q. LAN (2007): Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. Journal of Applied Microbiology, 1-13
43. RASMUSSEN, T. B. (2006): Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology, 152(4), 895–904.
44. RIVIERE, J. E., M. PAPICH (2018): Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 10th ed. Wiley-Blackwell, SAD, 40-60.
45. RUER, S., N. PINOTSIS, D. STEADMAN, G. WAKSMAN, H. REMAUT (2015): Virulence-targeted Antibacterials: Concept, Promise, and Susceptibility to Resistance Mechanisms. Chemical Biology & Drug Design, 86(4), 379–399.
46. RUSSELL A. D. (2004): Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. U: Denyer S. P., Hodges N. A. & German S. P. (eds.) Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology. 7th Ed. Blackwell Science, UK. 152-186.
47. SAWA, T., T. L. YAHR, M. OHARA, K. KURAHASHI, M. A. GROPPER, J. P. WIENER-KRONISH, D. W. FRANK (1999): Active and passive immunization with the Pseudomonas V antigen protects against type III intoxication and lung injury. Nature Medicine, 5(4), 392–398.
48. SCHILLING, A., E. NEUNER, S. J. REHM (2011): Vancomycin: A 50-something-year old antibiotic we still don't understand. Cleveland ClinicJournal of Medicine, 78(7), 465-471.

49. SCHOLAR, E., (2007): Sulfonamides u: xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier, (3700) 1-4.
50. SHAVER C. M., A. R. HAUSER (2004): Relative contributions of Pseudomonas aeruginosa ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. Infect Immune 72: 6969–6977
51. SPERANDIO, V. (2007): Novel approaches to bacterial infection therapy by interfering with bacteria-to-bacteria signaling. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 5(2), 271–276.
52. STOODLEY, P., K. SAUER, D. G. DAVIES, J. W. COSTERTON (2002): Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annual Review of Microbiology, 56(1), 187–209.
53. SYKES, R. B., D. P. BONNER (1985): Aztreonam: The first monobactam. The American Journal of Medicine, 78(2), 2–10.
54. ŠEOL B., K. MATANOVIĆ, S. TERZIĆ (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Zagreb, Medicinska naklada.
55. TABLL, A. (2015): Monoclonal antibodies: Principles and applications of immmunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. World Journal of Hepatology, 7(22), 2369-2383.
56. TAN, S., Y. TATSUMURA (2015): Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. Singapore Medical Journal, 56(07), 366–367.
57. TOUTAIN, P.-L., A. A. FERRAN, A. BOUSQUET-MELOU, L. PELLIGAND, P. LEES (2016): Veterinary Medicine Needs New Green Antimicrobial Drugs. Frontiers in Microbiology, 7, 1-16.
58. UNGEMACH, F. R., D. MÜLLER-BAHRDT, G. ABRAHAM (2006): Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. International Journal of Medical Microbiology, 296, 33–38.
59. VELKOV, T., K. D. ROBERTS, R. L. NATION, P. E. THOMPSON, J. LI (2013): Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. Future Microbiology, 8(6), 711–724.
60. VON DÖHREN, H. (2009): Antibiotics: Actions, origins, resistance, by C. Walsh. 2003. Washington, DC: ASM Press. 345 pp. $99.95 (hardcover). Protein Science, 13(11), 3059–3060

61. WU, H., C. MOSER, H. Z. WANG, N. HØIBY, Z. J. SONG (2014): Strategies for combating bacterial biofilm infections. International Journal of Oral Science, 7(1), 1–7.
62. YEAMAN, M. R. (2003): Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. Pharmacological Reviews, 55(1), 27–55.
63. ZHANG, J. M., J. AN (2007): Cytokines, Inflammation, and Pain. International Anesthesiology Clinics, 45(2), 27–37.

6. SAŽETAK

Antibiotici su, od otkrića u 20. st., postali najznačajniji lijekovi u povijesti medicine. Između 1940. i 1962. na tržište je izbačeno više od 20 novih vrsta antibiotika. Od tada su na tržište dospjele samo dvije nove skupine lijekova. Već prvi otkriveni antibiotik, penicilin, ostvario je značajan uspjeh. Bakteriolog Alexander Fleming već je tada predvidio nastanak rezistencije na penicilin, a rezistencija se razvila i prema kasnije nastalim antibioticima. Danas rezistencija predstvalja globalni javnozdravstveni problem. Rezistencija znatno ugrožava ljudsko zdravlje. Godišnje umre oko 33 000 ljudi uslijed infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama. Sve veći izazov antimikrobne rezistencije i nedostatak novih antibiotika, naglašavaju važnost razvoja novih terapija.

Rezistencija u bakterija može nastati promjenama u genomu i unosom vanjske DNA. Poznato je da veterinarska medicina znatno doprinosi nastanku rezistencije, budući da se antibiotici u životinja koriste kao promotori rasta. To je dovelo do potrebe za razvojem novih pristupa u liječenju bakterijskih infekcija. Jedan od obećavajućih pristupa je djelovanje na specifične faktore virulencije, tj. na sustave međustanične komunikacije. Veliki potencijal je pokazalo djelovanje na bakterijski QS. To je sposobnost otkrivanja i odgovaranja na gustoću stanične populacije putem regulacije gena. Nadalje, antimikrobni peptidi (AMP) su dobili veliku pozornost kao nova skupina lijekova. To su peptidni antibiotici koje karakterizira amfipatska priroda izvedena iz njihovih pozitivnih naboja i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka. Osim sredstava koja djeluju na bakterije, istraživanja su usmjerena i na poboljšanje imunološkog sustava domaćina. Trenutno, najveći potencijal kao alternativa antibioticima pokazuju cjepiva i protutijela te bakteriofagi.

Za otkrivanje najboljeg načina liječenja bakterijskih infekcija, trebaju se provesti ispitivanja antimikrobne osjetljivosti i utemeljiti koja vrsta bakterije uzrokuje bolest. Budući da rezistencija bakterija na antibiotike nije jedini problem, već i nedovoljan razvitak novih antibiotika, udruženje informacija i spoznaja s dosada provedenih istraživanja, moglo bi dovesti do pronalska novih vrsta antibiotika.

7. SUMMARY – New strategies in research and development of antimicrobial drugs

Antibiotics, from their discoveries in the 20th century, have become the most important drugs in the history of medicine. Between 1940. and 1962., more than 20 new classes of antibiotics were marketed. Since then, only two new drug classes have reached the market. The first discovered antibiotic, penicilin, has achieved significant success. During his research, Fleming already predicted emergence of resistance to penicilin, and resistance also developed to subsequent antibiotics. Today, resistance apperas to be a global public health issue. Resistance significantly endangers human health. About 33 000 people die every year due to infections caused by resistant bacteria. The growing challenge of antimicrobial resistance and the paucity of novel antibiotics underscore the importance of developing novel therapeutics.

Resistance to bacteria can be caused by changes in the genome or by the intake of external DNA. It is well known that veterinary medicine contributes significantly to the emergence of resistance, since antibiotics in animals are used as growth promoters. This has led to the need of developing new approaches to the treatment of bacterial infections. One of the promising approaches is targeting a specific virulence factors, i.e. intercellular comunication systems. Targeting bacterial QS has shown a great potential. Quorum sensing is the ability to detect and to respond to cell population density by gene regulation. Futhermore, AMPs received great attention as a new drug class. These are peptide antibiotics characterized by amphipatic nature derived from their positive charges and hydrophobic amino acid residues. In addition to agents that act on bacteria, the research is also focused on improving the immune system of the host. At present, the greatest potential as an alternative to antibiotics have vaccines, antibodies and bacteriophages.

To detect the best way to treat bacterial infections, antimicrobial sensitivity test should be conducted and the type of bacteria that causes the disease to be determined. Since bacterial resistance to antibiotics is not the only issue, but the insufficient development of new antibiotics, the information and knowledge by so far conducted researches could lead to discovery of new drug classes.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17. kolovoza 1993. godine u Našicama. Osnovnu školu „Grigor Vitez“ završila sam u Osijeku. Po završetku osnovne škole upisala sam Opću gimnaziju. Maturirala sam s odličnim uspjehom u ljeto 2012. godine i iste godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija isticala sam se trudom i zalaganjem. Tijekom svih šest godina bila sam redovan student. Također, za vrijeme studija radila sam studentski posao kao savjetnik zdrave ishrane kućnih ljubimaca u tvrtki Farmina Pet Foods. U slobodno vrijeme najradije čitam i bavim se kreativnim radom.