

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA LESAR

**VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI POTENCIALNIH  
INHIBITORJEV MUR LIGAZ NA STANDARDNIH  
BAKTERIJSKIH SEVIH**

**EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF NOVEL  
MUR LIGASES INHIBITORS ON REFERENCE  
BACTERIAL STRAINS**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za hemokulture in druge urgentne mikrobiološke preiskave (HEM) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Manice Mueller-Premru, dr. med.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm. in somentorice prof. dr. Manice Mueller-Premru, dr. med.

Predsednik komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Članica komisije: izr. prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

# VSEBINA

**POVZETEK..... V**

**SEZNAM OKRAJŠAV..... VI**

**1 UVOD ..... 1**

**1.1 ODKRITJE MIKROBOV IN RAZVOJ PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN .... 1**

**1.2 BAKTERIJE ..... 1**

1.2.1 ZGRADBA BAKTERIJSKE CELICE ..... 2

1.2.1.1 Citoplazma ..... 3

1.2.1.1.1 Genetski material ..... 3

1.2.1.1.2 Ribosomi ..... 3

1.2.1.2 Citoplazemska membrana ..... 3

1.2.1.3 Celična stena ..... 4

1.2.1.3.1 Peptidoglikan ..... 5

1.2.1.3.2 Biosinteza peptidoglikana ..... 6

1.2.1.3.3 Ligaze Mur ..... 8

1.2.2 PATOGENE BAKTERIJE ..... 10

1.2.2.1 *Staphylococcus aureus* ..... 10

1.2.2.2 *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) ..... 12

1.2.2.3 *Streptococcus pyogenes* ..... 13

1.2.2.4 *Enterococcus faecalis* ..... 14

1.2.2.5 *Escherichia coli* ..... 14

1.2.2.6 *Pseudomonas aeruginosa* ..... 15

**1.3 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE..... 16**

1.3.1 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI PROTIMIKROBNIM UČINKOVINAM ..... 17

1.3.1.1 Vrste odpornosti ..... 17

1.3.1.2 Mehanizmi odpornosti ..... 18

1.3.1.3 Problem odpornosti in njeno omejevanje ..... 18

1.3.2 NOVE PROTIMIKROBNE UČINKOVINE ..... 19

1.3.2.1 Bakterijska celična stena kot tarčno mesto za protimikrobne učinkovine ..... 19

1.3.2.2 Inhibitorji ligaz Mur ..... 20

1.3.2.2.1 Peptidni inhibitorji ligaz Mur ..... 20

1.3.2.2.2 Nizkomolekularni nepeptidni inhibitorji ligaz Mur ..... 22

1.3.3 VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN ..... 23

1.3.3.1 Kvalitativne metode ..... 23

1.3.3.1.1 Difuzijski antibiogram v agarju ..... 23

1.3.3.2 Kvantitativne metode ..... 24

1.3.3.2.1 Dilucijski antibiogram ..... 24

1.3.3.2.2 E-test (metoda difuzijskega gradienta) ..... 25

**2 NAMEN DELA..... 27**

**3 MATERIALI IN METODE ..... 28**

**3.1 POTENCIALNI INHIBITORJI LIGAZ MUR..... 28**

**3.2 STANDARDNI BAKTERIJSKI SEVI ..... 31**

**3.3 OPREMA ..... 32**

<b>3.4</b>	<b>METODE .....</b>	<b>33</b>
3.4.1	METODA MAKRODILUCIJSKEGA ANTIBIOGRAMA V MUELLER HINTON BUJONU .....	33
3.4.1.1	Priprava mikrobioloških gojišč in dodatkov .....	33
3.4.1.2	Priprava razredčin potencialnega inhibitorja ligaz Mur .....	34
3.4.1.3	Priprava bakterijskega inokuluma .....	35
3.4.1.4	Izvedba makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu .....	36
3.4.1.5	Izvedba dodatnega testiranja .....	37
3.4.1.6	Kontrola metode .....	37
3.4.2	METODA DILUCIJSKEGA ANTIBIOGRAMA V AGARJU .....	39
3.4.2.1	Priprava mikrobioloških gojišč in dodatkov .....	39
3.4.2.2	Priprava bakterijskega inokuluma .....	40
3.4.2.3	Izvedba dilucijskega antibiograma v agarju .....	41
3.4.2.4	Kontrola metode .....	41
<b>4</b>	<b><u>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</u></b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>INTERPRETACIJA REZULTATOV .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>DERIVATI D-GLUTAMINSKE KISLINE .....</b>	<b>44</b>
4.2.1	SPOJINI TT-96 IN TT-89 .....	44
4.2.2	SPOJINA DVR-40 .....	45
4.2.3	UČINKOVITOST DERIVATOV D-GLUTAMINSKE KISLINE .....	45
<b>4.3</b>	<b>DERIVATI BENZILIDEN RODANINA (BENZILIDEN-2-TIOOKSO-1,3-TIAZOLIDIN-4-ONA).....</b>	<b>46</b>
4.3.1	SPOJINA TT-111.....	46
4.3.2	SPOJINA TT-98.....	47
4.3.3	SPOJINA LKV-16 .....	49
4.3.4	SPOJINA TT-114.....	52
4.3.5	SPOJINA LKV-04 .....	56
4.3.6	SPOJINI LKV-02 IN LKV-05 .....	58
4.3.7	UČINKOVITOST DERIVATOV BENZILIDEN RODANINA (BENZILIDEN-2-TIOOKSO-1,3-TIAZOLIDIN-4-ONA) .....	58
<b>4.4</b>	<b>DERIVATI BENZILIDEN-1,3-TIAZOLIDIN-2,4-DIONA .....</b>	<b>59</b>
4.4.1	SPOJINA TT-107.....	59
4.4.2	SPOJINA LKV-14 .....	60
4.4.3	SPOJINA TT-113.....	61
4.4.4	UČINKOVITOST DERIVATOV BENZILIDEN-1,3-TIAZOLIDIN-2,4-DIONA .....	62
<b>4.5</b>	<b>DERIVATI BENZILIDEN BARBITURNE KISLINE (BENZILIDEN-2,4,6(1H,3H,5H)-PIRIMIDIN-TRIONA) IN BENZILIDEN TIOBARBITURNE KISLINE (BENZILIDEN-2-TIOOKSO-4,6(1H,5H)-PIRIMIDIN-DIONA).....</b>	<b>63</b>
4.5.1	SPOJINA KNZ-152 .....	63
4.5.2	SPOJINA KNZ-153B .....	64
4.5.3	SPOJINA KNZ-158B .....	66
4.5.4	SPOJINA KNZ-156 .....	67
4.5.5	UČINKOVITOST DERIVATOV BENZILIDEN BARBITURNE KISLINE (BENZILIDEN-2,4,6(1H,3H,5H)-PIRIMIDIN-TRIONA) IN BENZILIDEN TIOBARBITURNE KISLINE (BENZILIDEN-2-TIOOKSO-4,6(1H,5H)-PIRIMIDIN-DIONA) .....	68
<b>4.6</b>	<b>DERIVATI 2H-1,4-BENZOKSAZIN-3(4H)-ONA .....</b>	<b>69</b>
4.6.1	SPOJINA KNZ-64B .....	69
4.6.2	SPOJINA KNZ-66-2 .....	70
4.6.3	UČINKOVITOST DERIVATOV 2H-1,4-BENZOKSAZIN-3(4H)-ONA .....	72
<b>4.7</b>	<b>DERIVATI ACIL-HIDRAZONOV .....</b>	<b>72</b>
4.7.1	SPOJINA DVR-74 .....	73
4.7.2	SPOJINE DVR-102, DVR-91 IN DVR-84 .....	74

4.7.3	UČINKOVITOST DERIVATOV ACIL-HIDRAZONOV .....	74
<b>4.8</b>	<b>DERIVATI 2(1<i>H</i>)-KINOLINONA.....</b>	<b>75</b>
4.8.1	SPOJINA TT-77.....	75
4.8.2	SPOJINA TT-64.....	75
4.8.3	UČINKOVITOST DERIVATOV 2(1 <i>H</i> )-KINOLINONA .....	75
<b>4.9</b>	<b>DERIVATI TRIAZINA .....</b>	<b>76</b>
4.9.1	SPOJINI LKV-36 IN LKV-42 .....	76
4.9.2	UČINKOVITOST DERIVATOV TRIAZINA .....	76
<b><u>5</u></b>	<b><u>SKLEP.....</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>LITERATURA .....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>PRILOGA .....</u></b>	<b><u>I</u></b>

## POVZETEK

Pri terapiji infekcijskih bolezni se zadnje čase srečujemo s težavami zaradi odpornosti številnih bakterijskih sevov proti klasičnim protimikrobnim sredstvom. Zato je potreben razvoj vedno novih protibakterijskih učinkovin, potencialna tarča pa so encimi ligaze Mur, ki katalizirajo biosintezo peptidoglikana v bakterijski celični steni. Učinek protibakterijskih učinkovin *in vitro* preizkušamo na bakterijskih sevih z metodo antibiograma.

Sedemindvajsetim spojinam, načrtovanim kot inhibitorji ligaz Mur, z različnimi strukturnimi značilnostmi in z večinoma že testirano inhibitorno aktivnostjo na izoliranih ligazah Mur smo ovrednotili protibakterijsko učinkovitost v obliki minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) in minimalne baktericidne koncentracije (MBK) na standardnih bakterijskih sevih zbirke ATCC (American Type Culture Collection).

Z metodo dilucijskega antibiograma v Mueller Hinton bujonu smo vsem spojinam določili MIK in MBK na dveh po Gramu pozitivnih (*S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212) in dveh po Gramu negativnih (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) sevih, šestim najučinkovitejšim spojinam pa še na sevu MRSA (proti meticilinu odporni *S. aureus*). Dvema najučinkovitejšima spojinama smo z metodo dilucijskega antibiograma v agarju določili MBK še na dveh dodatnih po Gramu pozitivnih sevih, *S. pneumoniae* ATCC 49619 in *S. pyogenes* ATCC 19615.

Protimikrobno učinkovitost je pokazalo enajst spojin, skoraj vse na po Gramu pozitivne seve (predvsem na *S. aureus*, tudi odporni sev MRSA, manj pa na *E. faecalis*, *S. pneumoniae* in *S. pyogenes*), le tri pa na po Gramu negativne, vendar le na *P. aeruginosa*, ne pa tudi na *E. coli*. Samo dve spojini sta bili učinkoviti tako na po Gramu pozitivne kot negativne seve. Spojini TT-114 in LKV-16, derivata benziliden rodanina (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona), sta bili učinkoviti v dovolj nizkih koncentracijah za potencialno klinično uporabnost (MIK na *S. aureus* je od 0,5 µg/mL do 2 µg/mL oziroma 8 µg/mL) in bi bili primerni za nadaljne raziskave.

Kot strukturna skupina so bili najučinkovitejši derivati benziliden rodanina (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona), pa tudi benziliden-1,3-tiazolidin-2,4-diona in 2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-ona.

Rezultati so izpostavili dve obetavni spojini s protibakterijsko učinkovitostjo (LKV-16, TT-114), hkrati pa nam nakazujejo smer nadaljnega razvoja inhibitorjev ligaz Mur.

# SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenozintrifosfat
CFU	število bakterijskih celic, ki tvorijo kolonije (iz angl., Colony Forming Units)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ESBL	$\beta$ -laktamaza z razširjenim spektrom delovanja
G <sup>+</sup>	po Gramu pozitiven
G <sup>-</sup>	po Gramu negativen
IC <sub>50</sub>	srednja inhibitorna koncentracija (koncentracija inhibitorja, pri kateri je rezidualna aktivnost encima 50%)
KA	Krvni agar
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MH	Mueller Hinton
MHB	Mueller Hinton bujon
MHOX	Mueller Hinton-oxacillin agar
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvat-transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvat-reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat: mezodiaminopimelinat-ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezodiaminopimelinat D-alanil-D-alanin-ligaza
MurG	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin-transferaza

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PRSP	proti penicilinu odporni <i>Streptococcus pneumoniae</i>
RA	rezidualna aktivnost
RNK	ribonukleinska kislina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
T	temperatura
UDP	uridindifosfat
VRE	proti vankomicinu odporni <i>Enterococcus faecium</i> in <i>faecalis</i>



# 1 UVOD

## 1.1 ODKRITJE MIKROBOV IN RAZVOJ PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Mikroorganizmi so kot del okolja nujni za vzdrževanje ravnovesja v naravi, hkrati pa lahko pri človeku povzročijo številne infekcijske bolezni. Bakterije so odkrili pred skoraj 300 leti, prvi pa se je v boj z njimi leta 1867 podal R. Lister, ki je uvedel aseptičen princip v kirurgiji in s tem zmanjšal umrljivost pacientov po operacijah. Mikrobiološko podlago za opažen učinek je leta 1884 podal zdravnik R. Koch s postavitvijo Kochovih postulatov, s katerimi je dokazal povezavo med specifičnim mikroorganizmom in specifično boleznijo, ki jo ta povzroča. Približno v istem času je kemik L. Pasteur opazil antagonizem med bakterijami in spoznal, da lahko nekatere produkte sekundarnega metabolizma mikroorganizmov uporabimo v terapevtske namene.

Odkritje protimikrobnih učinkovin predstavlja enega najpomembnejših mejnikov v razvoju medicine. Prvi, ki je v začetku 20. stoletja sistematično pristopil k iskanju protimikrobnih sredstev, je bil biolog P. Erlich, ki je na podlagi razlik v barvanju humane in bakterijske celice postavil hipotezo o selektivni toksičnosti. Leta 1929 je A. Fleming naključno odkril penicilin, moderna doba protimikrobnih učinkovin pa se je dejansko začela leta 1935 z Domagkovim odkritjem sulfonamidov.

Danes nam znanje in tehnologija omogočata načrtovanje in sintezo številnih novih učinkovin v zelo kratkem času. Na tržišče občasno prihajajo nove protimikrobne učinkovine z delovanjem na širok spekter bakterij, vendar pa pojav vedno novih sevov odpornih bakterij teži k še hitrejšemu razvoju (1, 2a, 3a).

## 1.2 BAKTERIJE

Bakterije so enocelični prokariontski organizmi, ki se razmnožujejo s preprosto delitvijo. Večina bakterijskih celic je velika od 0,2 do 5  $\mu\text{m}$ , morfološko pa jih delimo v tri večje skupine:

- ❖ Koki (bakterije okrogle oblike), ki lahko nastopajo posamično ali pa so združeni v pare (diplokoke), skupine ali verižice.
- ❖ Bacili (bakterije paličaste oblike), ki so lahko debeli ali tanki, zviti ali razvejani in lahko tvorijo spore.

❖ Spirohete (bakterije spiralne oblike) (Slika 1).

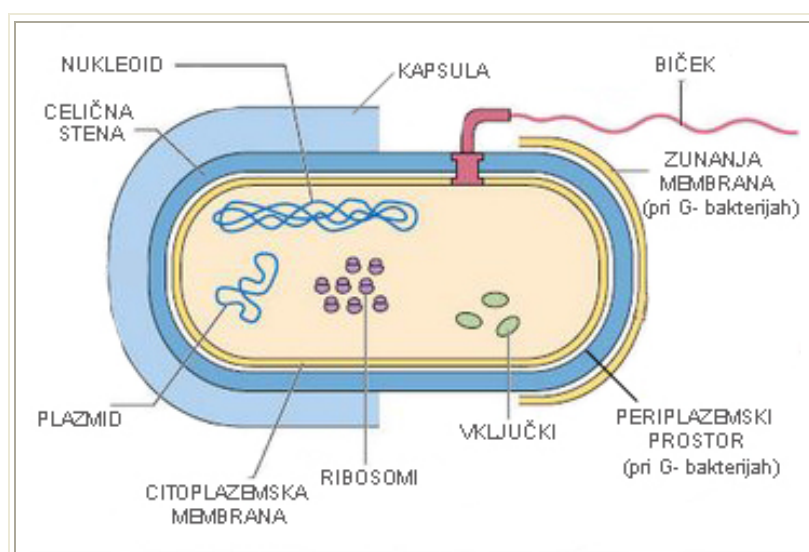


**Slika 1:** Značilne oblike bakterij: koki (levo), bacili (v sredini), spiroheta (desno).

Makroskopska manifestacija bakterijske rasti je na trdnem gojišču nastanek kolonije, v kateri so vse bakterije potomke ene celice in ima za neko bakterijsko vrsto značilno morfologijo ali motnost tekočega gojiščja. Da bakterijsko populacijo vidimo s prostim očesom, je potrebnih približno  $10^6$  celic na kvadratni milimeter ali mililiter.

### 1.2.1 Zgradba bakterijske celice

Zgradba bakterijske celice je preprostejša od zgradbe evkariontske celice, glavni razliki pa sta odsotnost jedra in celična stena, ki poleg citoplazemske membrane obdaja bakterijsko celico. Pri nekaterih bakterijskih vrstah se pojavljajo še dodatne strukture, kot so biček, pilus, kapsula in glikokaliks, nekatere pa tvorijo tudi spore (Slika 2).



**Slika 2:** Zgradba bakterijske celice.

### 1.2.1.1 Citoplazma

Citoplazma je poltekoč amorfen matriks znotraj celične membrane, sestavljen iz vode ter raztopljenih ali suspendiranih proteinov, encimov, lipidov, ogljikovih hidratov in ionov. V njej potekajo številni katabolni in anabolni procesi, je pa tudi nosilec za genetski material in nekatere celične strukture, kot so ribosomi in vključki (granule s hranilnimi snovmi, vezikli).

#### 1.2.1.1.1 Genetski material

Bakterije se razmnožujejo s preprosto delitvijo oziroma cepitvijo, ki ni enakovredna mitotski delitvi. Večina bakterij se cepi zelo hitro, saj nova generacija nastane že po dvajsetih minutah. Bakterijski genetski material ni združen v jedro, pač pa je v obliki nukleoida, to je ene same krožno (izjemoma linearno) oblikovane kromosomske molekule DNK v citoplazmi, pritrjene na celično membrano, ki vsebuje približno 2000 genov.

Nekatere bakterije imajo še plazmide, ki so samostojne zunajkromosomske prosto plavajoče krožne (izjemoma linearne) molekule DNK in so sposobne podvojevanja neodvisno od bakterijskega kromosoma. Plazmidi ne kodirajo življenjsko pomembnih funkcij, pač pa nosijo genske zapise za dodatne bakterijske strukture ter funkcije, med drugim za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam, in se lahko prenašajo med bakterijami ali se vključijo v kromosom. Podobno vlogo kot plazmidi imajo tudi transpozoni, t. i. lepljivi konci dela DNK molekule in integri, ki so se sposobni prenašati med plazmidi ali v kromosom.

#### 1.2.1.1.2 Ribosomi

Ribosomi so sestavljeni iz ribonukleinskih kislin in proteinov in so podobno kot v evkariontskih celicah odgovorni za sintezo proteinov. Njihova velikost se razlikuje od velikosti evkariontskih ribosomov, zato predstavljajo pomembno tarčo za delovanje nekaterih protimikrobnih učinkovin.

### 1.2.1.2 Citoplazemska membrana

Citoplazemska membrana je tanka struktura, ki obdaja bakterijsko celico in vzdržuje selektivno prepustno bariero med notranjostjo celice (citoplazmo) in okoljem, po drugi

strani pa omogoča komunikacijo med njima. Preko nje z difuzijo prehajajo manjše nepolarne molekule, polarne in nabite molekule pa potrebujejo posebne permeaze za aktivni transport. Ostale naloge citoplazemske membrane so sekrecija encimov in toksinov ter sodelovanje pri sintezi celične stene in celični delitvi, na njeni notranji strani pa so nameščeni še encimi dihalne verige za prenos elektronov ter encimi za tvorbo energije z oksidativno fosforilacijo.

Zgradba citoplazemske membrane je podobna zgradbi ostalih membran, saj s fosfolipidnim dvoslojem in proteini tvori model tekočega mozaika. Fosfolipid sestavljajo polarna glava (glicerolfosfat) in dva nepolarna repa (maščobni kislini), ki se v dvosloju usmerijo tako, da se nepolarni deli stikajo, polarni pa štrlijo proti notranjemu oziroma zunanjemu delu membrane. Proteini, ki plavajo v fosfolipidnem dvosloju, so lahko površinski, integralni ali transmembranski. Membrana je stabilizirana z vodikovimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami, dodatno pa s kalcijevimi in magnezijevimi ioni, ki tvorijo ionske vezi z negativno nabitimi fosfolipidi.

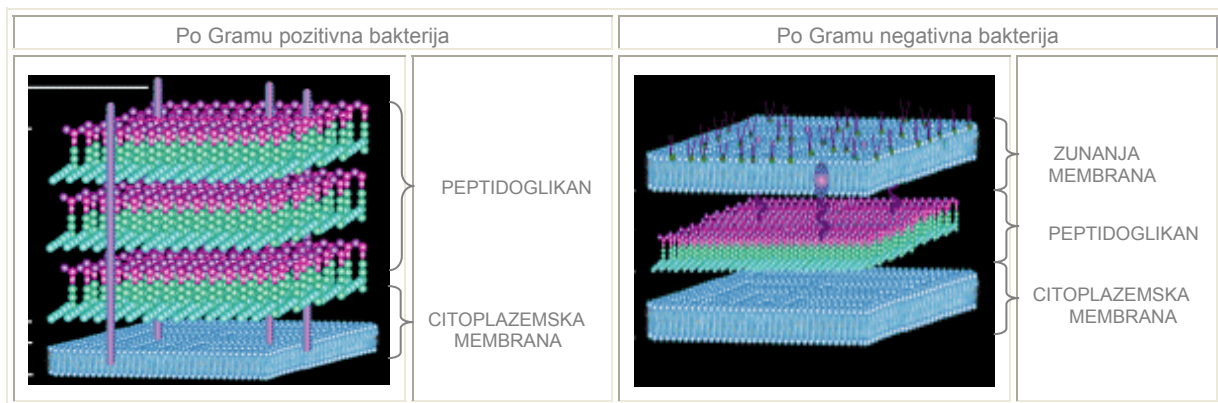
### 1.2.1.3 Celična stena

Bakterijska celična stena leži na zunanji strani citoplazemske membrane. Njene glavne naloge so zagotavljanje trdnosti ter oblike bakterijske celice, vzdrževanje njene integritete s kompenzacijo notranjega osmotskega tlaka in zaščita pred encimi gostitelja.

Z diferencialnim barvanjem po histologu H. C. Gramu lahko bakterije delimo na po Gramu pozitivne (modro obarvanje) in po Gramu negativne (rdeče obarvanje), glavna razlika med njimi pa je prav v sestavi in debelini celične stene, čeprav je pri obojih bistvena in specifična (pri evkariontskih celicah ni prisotna) sestavina peptidoglikan.

Celična stena  $G^+$  bakterij je enostavnejša, saj jo sestavlja do 40 plasti peptidoglikana, ki ga prebadajo in mestoma povezujejo s citoplazemsko membrano anionski polimeri teihoične, lipoteihoične in teihuronske kisline. Ti s svojimi fosfatnimi, hidroksilnimi in aminskimi skupinami tvorijo ionsko-izmenjevalni sistem, ki uravnava koncentracijo kalcijevih in magnezijevih ionov, ki so nujni za delovanje številnih encimov v sintezi peptidoglikana. Celična stena  $G^+$  bakterij je dobro prepustna za raztopljene snovi, tudi take z visoko molekulsko maso.

G<sup>-</sup> bakterije imajo med citoplazemsko membrano in celično steno periplazemski prostor, kjer se pri nekaterih sevih nahaja encim  $\beta$ -laktamaza, ki razgrajuje  $\beta$ -laktamske antibiotike. Peptidoglikan je samo eno- ali dvoplasten, nad njim pa leži še čvrstejša zunanja membrana, sestavljena iz fosfolipidov in proteinov, od katerih so nekateri oblikovani kot kanalčki (porini), ki selektivno prepuščajo snovi. Na osnovno strukturo so pripeti s kalcijevimi in magnezijevimi ioni elektrostatsko stabilizirani kompleksni lipopolisaharidi, ki predstavljajo endotoksine oziroma glavno antigensko determinanto, odgovorno za aktivacijo imunskega odgovora pri gostitelju. Prepustnost zunanje membrane je zelo omejena in specifična. Prepušča le nekatere manjše nepolarne molekule, ne pa tudi makromolekul, nenabitih polarnih molekul in lipofilnih spojin kot so barvila, maščobne kisline, detergenti in tudi nekatere protimikrobne učinkovine (eritromicin, rifampicin, vankomicin, nekateri penicilini). To je vzrok neučinkovitosti številnih protimikrobnih učinkovin na G<sup>-</sup> bakterije, saj na mesto delovanja ne prodrejo v dovolj visoki koncentraciji za doseg učinka (Slika 3) (2b, 3b, 4a, 5, 6, 7, 8).

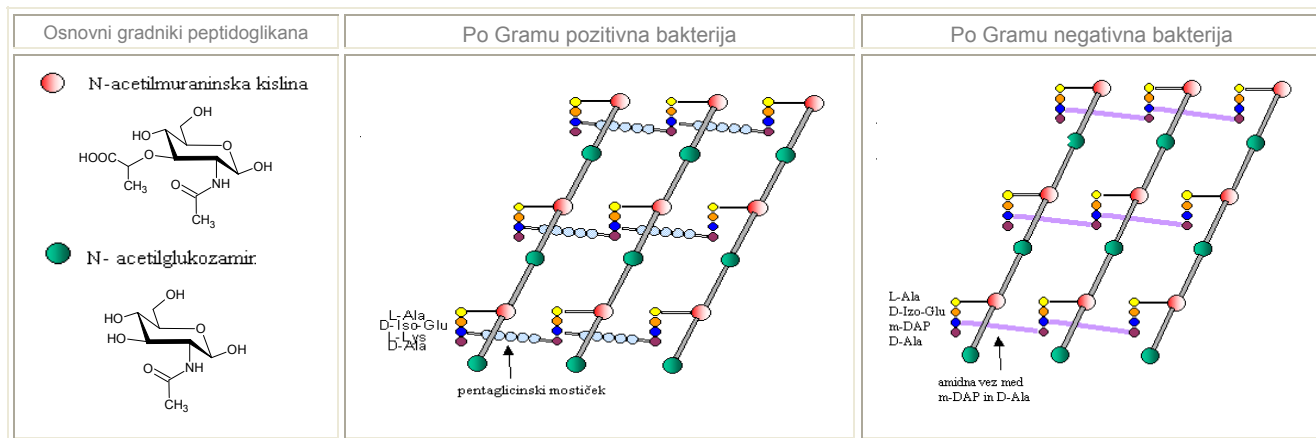


**Slika 3:** Zgradba celične stene po Gramu pozitivne (levo) in po Gramu negativne (desno) bakterije.

### 1.2.1.3.1 Peptidoglikan

Peptidoglikan sestavljajo linearne glikanske verige, prečno povezane s kratkimi peptidi. Glavna linearna glikanska vlakna tvorijo izmenjujoči se z 1,4- $\beta$  vezjo povezani ostanki *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline. D-laktilna skupina vsakega ostanka *N*-acetilmuraminske kisline je substituirana s peptidno verigo, ki jo najpogosteje sestavljajo L-alanin, D-glutaminska kislina, L-lizin ali *mezo*-2,6-diaminopimelinska kislina in dva D-alanina, od katerih se zadnji med nastajanjem peptidoglikana odcepi. Prečno premreženje glikanskih verig poteče med karboksilno skupino D-alanina in med amino skupino stranske

verige *mezo*-2,6-diaminopimelinske kisline ali L-lizina. Ta povezava se pri G<sup>-</sup> bakterijah tvori direktno, pri G<sup>+</sup> bakterijah pa preko kratkega peptidnega mostička (Slika 4) (5, 9, 10, 11). Podrobne raziskave peptidoglikana pri različnih vrstah bakterij so pokazale, da obstajajo manjše razlike tako v kemijski zgradbi glikanskih verig in peptidnih mostičkov kot tudi v fini strukturi (9).



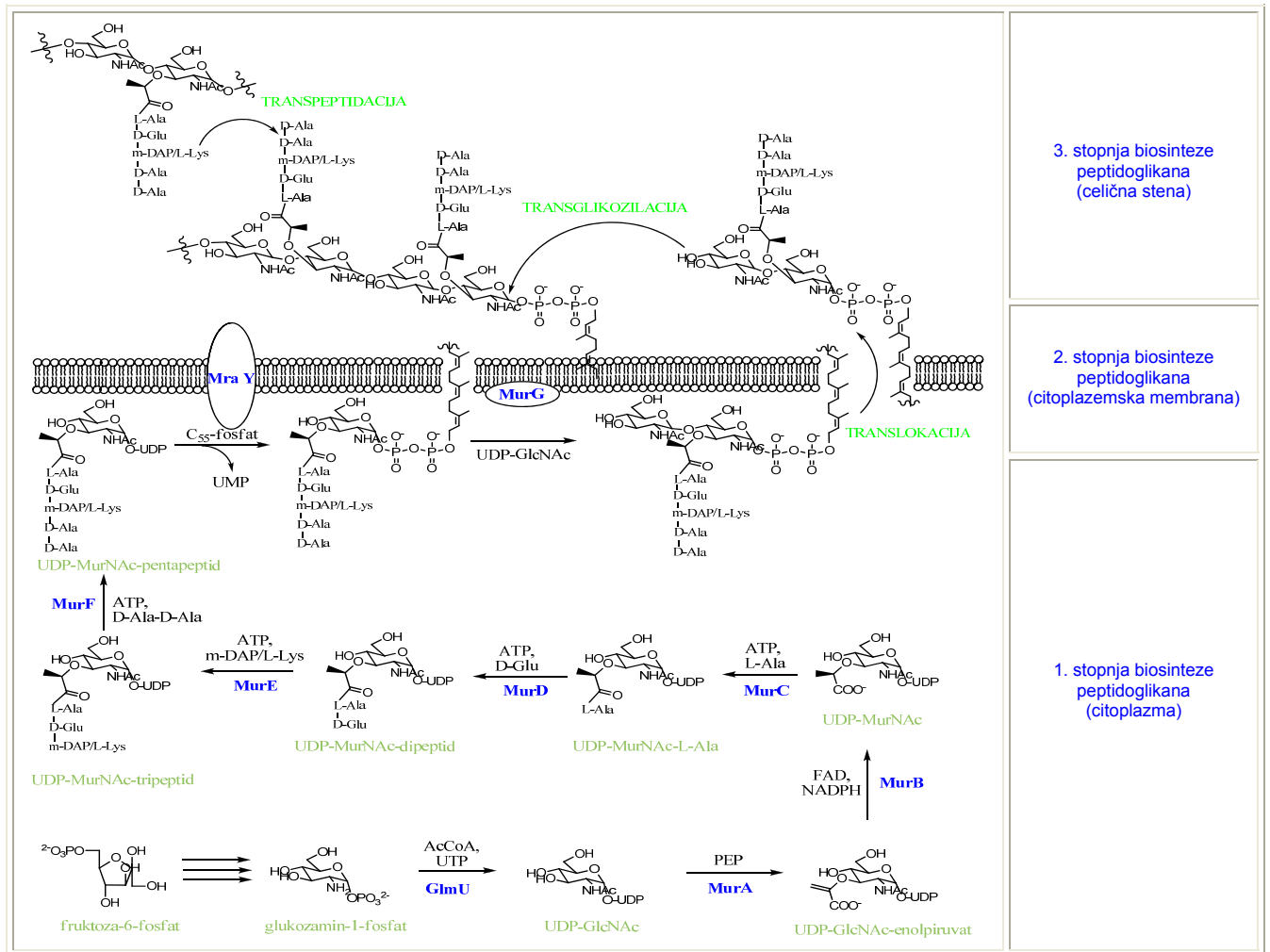
**Slika 4:** Zgradba peptidoglikana pri po Gramu pozitivni (levo) in po Gramu negativni (desno) bakteriji.

### 1.2.1.3.2 Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, sestavljen iz skoraj dvajsetih korakov, ki zahtevajo zanje specifične encime. Raziskave bakterijske genomike pri *E. coli* so pokazale, da je večina genov, vpletenih v biosintetski proces, zbranih v dveh regijah, *mra* in *mrB*. Biosinteza poteka na treh nivojih. V prvi stopnji se v citoplazmi sintetizirajo nukleotidni prekursorji, ki se v drugi stopnji s pomočjo lipidnega prenašalca prenesejo čez citoplazemsko membrano v celično steno, kjer se v tretji stopnji pritrjujejo na že obstoječi peptidoglikan (Slika 5).

V prvi, znotrajcelični oziroma citoplazemski stopnji biosinteze, najprej s serijo reakcij, ki jih katalizira družina encimov Glm, iz fruktoze-6-fosfata nastane UDP-*N*-acetilglukozamin, ta pa se s serijo reakcij, ki jih katalizira družina encimov Mur pretvori najprej v UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino, nato pa še v UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptid. MurA transferaza najprej prenese enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata na mesto 3 UDP-*N*-acetilglukozamina. V naslednjem koraku encim MurB reduktaza reducira nastali enolpiruvatni del v D-laktat, tako da nastane UDP-*N*-acetilmuraminska kislina. Na prosto

karboksilno skupino laktilnega etra UDP-*N*-acetilmuraminske kisline se nato preko amidne vezi pripne pet aminokislin. Te reakcije katalizira skupina od ATP odvisnih aminokislinskih ligaz MurC, MurD, MurE in MurF. Najprej se zaporedoma s pomočjo MurC, MurD in MurE vežejo L-alanin, D-glutaminska kislina (nastane iz L-glutaminske kisline s pomočjo racemaze MurI) in L-lizin pri G<sup>+</sup> ali *mezo*-2,6-diaminopimelinska kislina pri G<sup>-</sup> bakterijah, nato pa s pomočjo MurF še dipeptid D-alanin-D-alanin, ki v citoplazmi nastane ločeno s pomočjo alanin-racemaze in D-alanin-sintetaze.



**Slika 5:** Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana

V drugi stopnji biosinteze, ki poteka na citoplazmski membrani, se glavna gradnika glikanskih verig peptidoglikana, UDP-*N*-acetilglukozaamin in UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptid, povežeta z glikozidno vežjo v disaharid pentapeptid. Translokaza MraY najprej prenese molekulo UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptida na membransko vezan lipidni prenašalec undekaprenil-fosfat oziroma C<sub>55</sub>-izoprenoid fosfat, tako da nastane Lipid

1. Nanj se nato s pomočjo glikoziltransferaze MurG preko 1,4- $\beta$  glikozidne vezi pripne še molekula UDP-*N*-acetilglukozamina, tako da nastane Lipid 2, ki je končna monomerna enota za izgradnjo peptidoglikana.

V tretji stopnji biosinteze se Lipid 2 s procesom translokacije dokončno prenese čez citoplazemsko membrano in se v procesu transglikozilacije, ki ga katalizira *N*-acetilglukozamin-pentapeptid transglikozilaza, preko glikozidnih vezi poveže z disaharidnimi enotami že izgrajenega peptidoglikana. Hkrati se od že izgrajenega peptidoglikana odcepi molekula lipidnega prenašalca in se reciklira v obliki pirofosfata. Nato s pomočjo transpeptidaz poteče premreženje peptidnih verig. Transpeptidaza se najprej veže na D-alanil-D-alaninsko enoto pentapeptidne verige *N*-acetilmuraminske kisline nastajajoče glikanske verige, peptidna vez med D-alaninskima ostankoma se razcepi in terminalni D-alanin se odstrani. Energija, ki se pri tem sprosti, se porabi za tvorbo prečne povezave, saj nastane nova peptidna vez med karboksilno skupino preostalega alanina in končno  $\epsilon$ -amino skupino ostanka *mezo*-2,6-diaminopimelinske kisline sosednje regije peptidoglikana (5, 10, 11, 12).

### 1.2.1.3.3 Ligaze Mur

Ligaze Mur oziroma Mur sintetaze so podskupina encimov iz družine Mur, ki v procesu biosinteze peptidoglikana na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino pripnejo skupino petih aminokislin. Mednje spadajo MurC, MurD, MurE in MurF.

Kristalna struktura ligaz Mur pri različnih bakterijskih vrstah je pokazala, da imajo vse štiri skupno tridimenzionalno strukturo v treh domenah: centralni, C-terminalni in N-terminalni. Centralna domena je odgovorna za vezavo ATP, C-terminalna za vezavo aminokislinskega ostanka, N-terminalna pa za vezavo UDP-prekursorja. Encimi obstajajo v odprti in zaprti konformaciji, kar je najbrž posledica vezave liganda.

Ligaze Mur katalizirajo sintezo amidne oziroma peptidne vezi. Proučevanje katalitičnih mehanizmov je pokazalo, da vsi štirje encimi verjetno delujejo po enakem mehanizmu. Najprej s pomočjo ATP aktivirajo karboksilno skupino C-terminalne aminokisline nukleotidnega substrata, hkrati pa poteče hidroliza ATP do ADP in organskega fosfata. Nastane acil-fosfatni intermediat, ki ga nukleofilno napade amino skupina pripenjajoče se aminokisline ali dipeptida. Nastane fosforiliran tetraedrični intermediat, ki se razcepi na



amid in organski fosfat. Za reakcijo so nujni še dvovalentni magnezijevi ali manganovi ioni (5, 10, 11, 13).

### **MurC**

Encim MurC pripne prvo aminokislino, najpogosteje L-alanin, na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino. Njegova kristalna struktura je bila najprej določena pri *Haemophilus influenzae*. Sestavljajo ga tri strukturne domene, na stiku katerih leži aktivno mesto encima s specifičnimi vezavnimi mesti za tri substrate.

Raziskave so pokazale, da se v poteku reakcije v svoje vezavno mesto na mejni površini med centralno in C-terminalno domeno najprej veže ATP, ob tem pa pride do pretvorbe encima v aktivno konformacijo. Naslednja se v vezavno mesto na N-terminalni domeni veže UDP-*N*-acetilmuraminska kislina, kot zadnji pa v vezavno mesto na C-terminalni domeni L-alanin. Specifičnost za alanin izhaja iz lastnosti žepa, sestavljenega iz stranskih verig His 348, His 376, Tyr 346 in Ala 459, saj njegova plitvost preprečuje vezavo večjih aminokislin, njegova hidrofobnost pa vezavo manjših polarnih aminokislin (10, 12, 14).

### **MurD**

Naslednjo aminokislino, D-glutaminsko kislino, pripne encim MurD. Najbolj proučena kristalna struktura encima izhaja iz *E. coli*. Podobno kot ostale ligaze Mur je sestavljen iz treh strukturnih domen, aktivno mesto pa leži v kotanji med njimi.

Raziskave kristalnih struktur kompleksov encima z različnimi substrati in produkti podpirajo tezo o katalitskem mehanizmu, ki poteka preko acil-fosfatnega intermedjata. Tako se v poteku reakcije v svoje vezavno mesto na centralni domeni najprej veže ATP, naslednji v vezavno mesto, ki je delno na N-terminalni in delno na centralni domeni, UDP-*N*-acetilmuramil-L-alanin in kot zadnja D-glutaminska kislina v vezavno mesto na C-terminalni domeni (10, 11, 15, 16).

### **MurE**

Tretjo aminokislino, L-lizin pri G<sup>+</sup> ali *mezo*-2,6-diaminopimelinsko kislino pri G<sup>-</sup> bakterijah, pripne encim MurE. Tudi pri MurE najbolj proučena kristalna struktura izhaja iz *E. coli* in razkriva tri strukturne domene, na katerih ležijo vezavna mesta za tri substrate.

Encim vsebuje tudi posebno strukturno determinanto, ki določa, ali se bo na nukleotidni prekursor vezal L-lizin ali *mezo*-2,6-diaminopimelinska kislina (11).

## **MurF**

Kot zadnji izmed ligaz Mur deluje encim MurF, ki pripne dipeptid D-alanil-D-alanin. Iz *E. coli* izolirana kristalna struktura razkriva tri strukturne domene z vezavnimi mesti za tri substrate. Domene v samostojnem encimu MurF oblikujejo odprto konformacijo v obliki polmeseca, kjer kataliza ni možna, zato sklepajo, da pride med vezavo substratov do zaprtja strukture (10, 11).

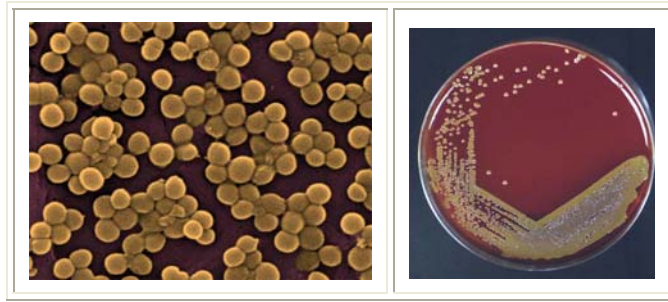
## **1.2.2 Patogene bakterije**

Človeka naseljujejo številne nepatogene bakterije, ki običajno ne povzročajo bolezni, pač pa predstavljajo njegovo stalno normalno mikrobno floro. Nekatere od njih so oportunistični patogeni, ki lahko povzročijo bolezni pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom.

Patogene bakterije so tiste, ki se upirajo imunskim mehanizmom gostitelja in so sposobne povzročiti bolezen, kar jim omogočajo virulentni dejavniki. To so lahko adhezini (biček, fimbrija, pilus, kapsula, biofilm), ki omogočajo pritrjevanje bakterije na gostiteljevo celico, invazini (različni encimi in druge beljakovine), ki omogočajo invadiranje v tkiva ali endotoksini (lipopolisaharidni deli celične stene  $G^-$  bakterij) in močnejši eksotoksini (topni proteini, ki se izločajo iz  $G^+$  in  $G^-$  bakterij). Nekatere bakterije so sposobne izzvati specifično bolezen, druge pa povzročajo splošne okužbe tkiv oziroma organov. Različni sevi iste bakterijske vrste lahko izkazujejo različen profil občutljivosti oziroma odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam (3d).

### **1.2.2.1 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* je  $G^+$  kok, ki nastopa v gručah. Na krvnem agarju raste v obliki gladkih, zlatorumenih, do dva milimetra velikih kolonij (Slika 6).



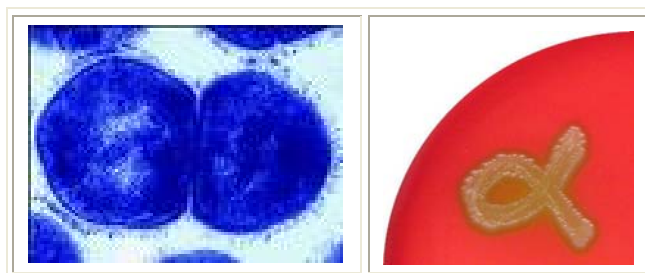
**Slika 6:** Bakterije *S. aureus* pod mikroskopom (levo) in kolonije na KA (desno).

*S. aureus* je del normalne mikroflore kože in nosne sluznice, hkrati pa je eden izmed najpogostejših povzročiteljev okužb pri človeku. Povzroča gnojne okužbe kože in mehkih tkiv (absces, impetigo, furunkel...), okužbe ran, predvsem v bolnišničnem okolju okužbe dihal (pljučnico), endokarditis in osteomielitis, lahko pa tudi bakteriemijo, sepsa, sindrom toksičnega šoka in gastroenteritis. Več kot 90% sevov *S. aureus* proizvaja encim  $\beta$ -laktamazo, ki razgrajuje  $\beta$ -laktamske antibiotike, zato za zdravljenje večine okužb uporabljajmo na  $\beta$ -laktamazo odporne peniciline (kloksacilin, nafcilin) ali peniciline v kombinaciji z inhibitorjem  $\beta$ -laktamaze (amoksicilin in klavulanska kislina).

Proti meticilinu/nafcilinu/oksacilinu odporni *S. aureus* (MRSA, iz angl.: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) se od za meticilin občutljivih sevov *S. aureus* (MSSA, iz angl.: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) razlikuje po tem, da je odporen proti vsem, tudi proti za  $\beta$ -laktamazo odpornim  $\beta$ -laktamskim antibiotikom. Sevi MRSA so bili sprva znani kot eni glavnih povzročiteljev bolnišničnih okužb, danes pa se vse pogosteje pojavljajo tudi v domačem okolju. Njihova odpornost je posledica sprejetja gena *mecA*, ki kodira penicilin-vezavni protein PBP2a z zmanjšano afiniteto za  $\beta$ -laktamske antibiotike. Ta odpornost je pogosto povezana še s paralelno odpornostjo na druge skupine protimikrobnih učinkovin, tako da je zdravljenje okužb z MRSA večkrat omejeno na glikopeptidne antibiotike (vankomicin), čeprav so se že pojavili tudi sevi *S. aureus* z zmanjšano občutljivostjo (VISA, iz angl.: vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*) oziroma popolno odpornostjo proti vankomicinu (VRSA, iz angl.: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) (4c, 4e, 17, 18, 19, 20).

### 1.2.2.2 *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*)

*S. pneumoniae* je lancetno oblikovan G<sup>+</sup> kok, lahko obdan s polisaharidno kapsulo, ki najpogosteje nastopa v parih (diplokok), lahko pa tudi v krajših verižicah. Raste le na s krvjo obogatenih gojiščih, na katerih tvori kolonije, obdane s pasom alfa hemolize (zelen pas zaradi nepopolne lize eritrocitov), ki je posledica produkcije pneumolizina (Slika 7).

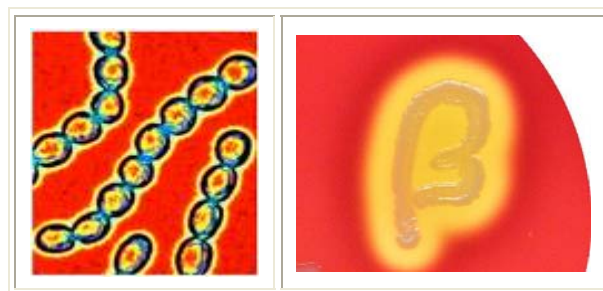


**Slika 7:** Bakterije *S. pneumoniae* pod mikroskopom (levo) in kolonije z značilno alfa hemolizo na KA (desno).

Pri približno 20% otrok in 5% odraslih je *S. pneumoniae* del normalne mikroflore nosnožrelne sluznice, do bolezni pa pride, kadar kolonizira bolj oddaljena tkiva. Takrat povzroči gnojne okužbe dihal (pljučnico, bronhitis, otitis...), lahko pa tudi meningitis, bakteriemijo in sepso. Ker ne proizvajajo  $\beta$ -laktamaze, je večina sevov občutljivih za  $\beta$ -laktamske antibiotike, vendar pa se pojavlja vedno več odpornih sevov *S. pneumoniae*, ki kažejo spremembe v penicilin-vezavnih proteinih in so zato odporni proti penicilinom in tudi širokospektralnim cefalosporinom (PRSP, iz angl.: penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*). Za zdravljenje takih okužb uporabljamo eritromicin ali vankomicin. V zadnjem času je zaskrbljujoče tudi naraščanje odpornosti sevov *S. pneumoniae* proti makrolidnim antibiotikom (zaradi povratnega črpanja iz celice, kodiranega z genom *mefE* ali modifikacije ribosoma z metilacijo, kodirane s plazmidnima genoma *ermA* in *ermB*), tetracikline (zaradi s transpozonskima genoma *tetM* in *tetO* kodiranih proteinov z GTP-azno aktivnostjo za premestitev tetraciklina iz ribosoma), fluorokinolone (zaradi mutacije kromosomskih genov *gyrA*, *gyrB*, *parC* in *parE*, ki kodirajo DNK girazo oziroma topoizomerazo IV ali povratnega črpanja iz celice, kodiranega z genom *pmrA*), sulfonamide, trimetoprim in kloramfenikol (4c, 4e, 21, 22, 23, 24, 25).

### 1.2.2.3 *Streptococcus pyogenes*

*S. pyogenes* je G<sup>+</sup> kok s kapsulo iz hialuronske kisline, ki nastopa v verižicah. Njegova rast je najoptimalnejša na s krvjo obogatenem krvnem agarju z majhnimi koncentracijami glukoze, na katerem tvori kolonije, obdane s pasom beta hemolize (prozoren pas zaradi popolne lize eritrocitov) (Slika 8).

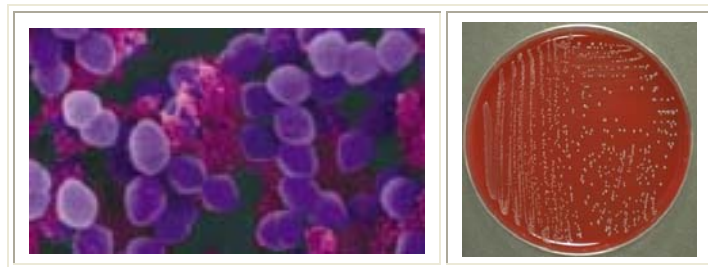


**Slika 8:** Bakterije *S. pyogenes* pod mikroskopom (levo) in kolonije z značilno beta hemolizo na KA (desno).

*S. pyogenes* je del normalne mikroflore grla pri 15 do 20% ljudeh, sicer pa povzroča gnojne in negojne okužbe dihal (angino, pljučnico...), kože in ran (celulitis, impetigo, šen...), škrlatinko, lahko pa tudi resnejša obolenja, kot so endokarditis, toksični šok in sepsa. Možni kasnejši zapleti okužbe so revmatična vročica in akutni glomerulonefritis. Okužbe s *S. pyogenes* zdravimo z  $\beta$ -laktamskimi antibiotiki, v primeru alergije na peniciline pa z eritromicinom ali klindamicinom. Prav zaradi tega v zadnjem času narašča odpornost sevov *S. pyogenes* proti makrolidnim antibiotikom (zaradi povratnega črpanja iz celice, kodiranega z genom *mefA* ali modifikacije ribosoma z metilacijo, kodirane s plazmidnima genoma *ermA* in *ermB*), pojavljajo pa se tudi sevi *S. pyogenes*, odporni proti tetraciklinom (zaradi s transpozonskimi geni *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *tetT* in *tetW* kodiranih proteinov z GTP-azno aktivnostjo za premestitev tetraciklina iz ribosoma ali povratnega črpanja iz celice, kodiranega z genoma *tetK* in *tetL*) (4c, 4e, 25, 26).

#### 1.2.2.4 *Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* je G<sup>+</sup> kok, ki najpogosteje nastopa v verižicah, lahko pa tudi posamično ali v parih. Na krvnem agarju tvori drobne kolonije brez hemolitičnih pasov (Slika 9).



**Slika 9:** Bakterije *E. faecalis* pod mikroskopom (levo) in kolonije na KA (desno).

*E. faecalis* je del normalne mikroflore kolona, predvsem pri post-operativnih bolnikih pa lahko povzroči gnojne okužbe ran, urinarnega, genitalnega in žolčnega trakta, endokarditis in sepso. Okužbe z *E. faecalis* zdravimo s sinergistično kombinacijo penicilina ali vankomicina in aminoglikozidnega antibiotika (gentamicina). Sam gentamicin nima učinka, ker ne prehaja bakterijske celične stene, penicilin ali vankomicin pa steno oslabita in mu s tem omogočita prodiranje v bakterijsko celico. Predvsem v bolnišničnem okolju so znani sevi *E. faecalis* in *E. faecium*, odporni proti vankomicinu (VRE, iz angl.: vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.), včasih pa tudi proti teikoplaninu. Okužbe z njimi uspešno zdravimo z linezolidom (4c, 4e, 27, 28).

#### 1.2.2.5 *Escherichia coli*

*E. coli* je G<sup>-</sup> bacil s polisaharidno kapsulo, peritrihno razporejenimi bički in pilusi, ki spada med enterobakterije (Slika 10).

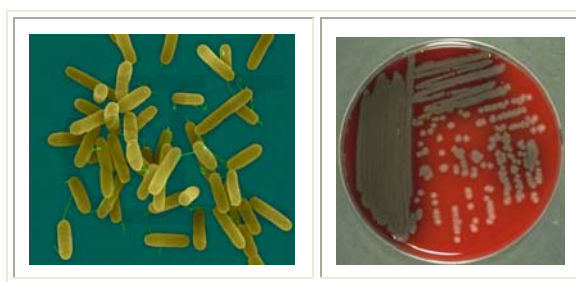


**Slika 10:** Bakterije *E. coli* pod mikroskopom (levo) in kolonije na KA (desno).

*E. coli* je del normalne mikroflore črevesa in zunanjih sečil, lahko pa povzroči blažje okužbe urinarnega trakta ali diarejo, ki je ponavadi ne zdravimo s protimikrobnimi učinkovinami. Posledici okužbe sta lahko tudi neonatalni meningitis in sepsa, ki jo zdravimo s parenteralno uporabnimi protimikrobnimi učinkovinami, naprimer cefalosporini tretje generacije ali aminoglikozidnimi antibiotiki (gentamicinom). Veliko sevov *E. coli* izkazuje visoko intrinzično odpornost proti številnim protimikrobnim učinkovinam zaradi povratne črpalke, kodirane z genom *acrAB*. Večkratno odporni sevi *E. coli*, ki se pojavljajo tudi v zunajbolnišničnem okolju, izločajo  $\beta$ -laktamazo z razširjenim spektrom delovanja ESBL (iz angl.: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase), ki poleg penicilinov in cefalosporinov prve generacije razgrajujejo tudi cefalosporine tretje in četrte generacije, ne pa tudi karbapenemov in zaviralcev  $\beta$ -laktamaz. Identificiranih je več kot 150 različnih tipov ESBL, vsak z drugačnim profilom odpornosti. Tako so se naprimer pojavili sevi *E. coli* s tipom ESBL, imenovanim CTX-M, ki so odporni ne samo proti cefalosporinom, pač pa tudi proti fluorokinolonom in trimetoprimu. Zaradi te raznolikosti v odpornosti je zdravljenje okužb z *E. coli* še posebej težavno, največkrat pa uporabljamo karbapeneme ali cefotetan in piperacilin v kombinaciji z tazobaktamom (4d, 4e, 27, 29, 30, 31, 32).

#### 1.2.2.6 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* je  $G^-$  bacil z bičkom, ki običajno nastopa v obliki bakterijskega biofilma (Slika 11).



**Slika 11:** Bakterije *P. aeruginosa* pod mikroskopom (levo) in kolonije na KA (desno).

*P. aeruginosa* najdemo v okolju, le pri približno 5% ljudi pa je del normalne mikroflore kože in kolona. Kot oportunistični patogen predvsem v bolnišničnem okolju povzroča okužbe urinarnega trakta, kože, ran in kosti, lahko tudi pljučnico in sepsa. Številni sevi *P. aeruginosa* izkazujejo visoko intrinzično odpornost zaradi tvorbe bakterijskega biofilma,

nenavadno omejene prepustnosti za G<sup>-</sup> bakterije značilne zunanje membrane ter genov za povratno črpalko (gen *acrAB*) in β-laktamazo, lahko tudi z razširjenim spektrom delovanja (ESBL). Načrt zdravljenja zato ponavadi pripravimo za vsak posamezen izolat, zdravilo izbora pa je običajno antipseudomonasni cefalosporin ceftazidim ali kombinacija piperacilina in aminoglikozidnega antibiotika (gentamicina) (4d, 4e, 29, 30, 33, 34).

### 1.3 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Antibiotiki so kemijsko definirani sekundarni metaboliti različnih vrst živih mikroorganizmov (bakterij, nižjih gliv) in njihovi polsintezni analogi. Nekateri med antibiotike prištevajo tudi s kemijsko sintezo pridobljene protimikrobne učinkovine, vendar te običajno uvrščamo v večjo skupino kemoterapevtikov. Protimikrobne učinkovine, ki so dandanes v uporabi, so večinoma kemoterapevtiki.

Protimikrobne učinkovine v nizkih koncentracijah uničijo mikroorganizme, torej delujejo baktericidno, ali pa le zavirajo njihovo rast in razmnoževanje, torej delujejo bakteriostatično. Različne protimikrobne učinkovine imajo različen spekter delovanja, kar pomeni, da učinkujejo na različne vrste mikroorganizmov. Delujejo po principu selektivne toksičnosti, torej so za gostitelja relativno netoksični, kar dosežemo z izkoriščanjem razlik v strukturi in metabolizmu bakterijske in človeške celice.

Protimikrobne učinkovine delimo v skupine glede na fizikalne lastnosti, kemijsko strukturo, farmakološke lastnosti (spekter delovanja) in mehanizem delovanja v bakterijski celici oziroma tarčno mesto:

- ❖ Inhibitorji sinteze bakterijske celične stene (β-laktamski antibiotiki, glikopeptidni antibiotiki, cikloserin, bacitracin).
- ❖ Učinkovine, ki spremenijo permeabilnost bakterijske citoplazemske membrane, kar vodi v izgubo znotrajceličnih snovi (polimiksini, amfotericin B).
- ❖ Učinkovine, ki z delovanjem na ribosomalne podenote reverzibilno inhibirajo sintezo bakterijskih znotrajceličnih beljakovin (tetraciklini, kloramfenikol, eritromicin, klindamicin, linezolid) ali tako spremenijo njihovo sintezo, da pride do celične smrti (aminoglikozidni antibiotiki).
- ❖ Inhibitorji DNK topoizomeraze ali DNK giraze (kinoloni) in od DNK odvisne RNK polimeraze (rifampicin), ki preprečujejo oblikovanje kromosoma in antimetaboliti, ki inhibirajo encime, sodelujoče v sintezi tetrahidrofolne kisline



### 1.3.1 Odpornost bakterij proti protimikrobnim učinkovinam

Uporaba protimikrobnih učinkovin ni samo močno zmanjšala smrtnosti zaradi infekcijskih bolezni, pač pa nenehna izpostavljenost bakterij protimikrobnim sredstvom ustvarja selekcijski pritisk nanje in povzroča razvoj mehanizmov odpornosti. Tako so se postopno razvili bakterijski sevi, ki so odporni proti posamezni ali celo večim protimikrobnim učinkovinam. Odpornost oziroma rezistenca je stanje neobčutljivosti ali zmanjšane občutljivosti mikroorganizma za učinkovino, ki običajno deluje bakteriostatično ali baktericidno (27, 37).

#### 1.3.1.1 Vrste odpornosti

Bakterijska odpornost je genotipska in/ali fenotipska značilnost. Ločimo posamično, večkratno in navzkrižno odpornost. Navzkrižna odpornost je odpornost proti kemijsko sorodnim protimikrobnim spojinam z enakim mehanizmom odpornosti, večkratna odpornost pa odpornost proti kemijsko nesorodnim protimikrobnim spojinam z različnimi mehanizmi odpornosti.

Glede na izvor ločimo naravno (prirojeno, intrinzično), fiziološko in pridobljeno odpornost. Naravna odpornost je nastala že v predantibiotični dobi, zanjo pa je značilno, da je zaradi genetskih, strukturnih in fizioloških lastnosti vsa bakterijska vrsta odporna proti neki skupini protimikrobnih učinkovin, ker ne obstajajo tarčna mesta, na katero učinkovina deluje. Primer je rod *Mycoplasma*, odporen proti  $\beta$ -laktamskim antibiotikom, ker nima peptidoglikana. Fiziološka odpornost se pojavlja le ob nekaterih pogojih. Najznačilnejši je primer tvorbe bakterijskega biofilma (naprimer pri *P. aeruginosa*), kjer bakterijsko kolonijo obdaja dodatna zunajcelična struktura, ki ovira prehod protimikrobnih učinkovin. Najpomembnejša in najbolj zaskrbljujoča je pridobljena odpornost, ki je značilna samo za nekatere seve neke bakterijske vrste ali rodu in je rezultat spremenjene celične strukture in fiziologije. Je posledica genetskih sprememb zaradi mutacij kromosomskega ali plazmidnega gena ali pridobitve novih genskih informacij s horizontalnim genskim prenosom. R-geni z zapisom za odpornost se v bakterijski populaciji širijo s prenosom plazmidov, transpozonov in integronov. Prenos poteče s

transformacijo (privzem dela eksogene DNK z r-genom iz okolja), s transdukcijo (prenos r-genov z bakteriofagom) ali s konjugacijo (prenos r-genov z neposrednim kontaktom dveh bakterijskih celic preko pilusa) (6, 33, 34, 37, 38, 39).

### 1.3.1.2 Mehanizmi odpornosti

Osnovni mehanizmi, po katerih pri bakterijah pride do odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam, so:

- ❖ Popolna sprememba ali zmanjšana afiniteta tarčnega mesta za učinkovino ( $\beta$ -laktamski antibiotiki, eritromicin, streptomycin, vankomicin, rifampicin, kinoloni, sulfonamidi, trimetoprim).
- ❖ Inaktivacija ali razgradnja učinkovine z encimi (glavni mehanizem pri  $\beta$ -laktamskih antibiotikih, aminoglikozidnih antibiotikih, kloramfenikolu).
- ❖ Zmanjšana prepustnost citoplazemske membrane za učinkovino, najpogosteje s spremembami porinov ( $\beta$ -laktamski antibiotiki, aminoglikozidni antibiotiki).
- ❖ Aktivno izčrpavanje učinkovine iz celice z neke vrste aktivnim transportom (tetraciklini, sulfonamidi).
- ❖ Sprememba presnovne poti, na katero deluje učinkovina (bakterije, odporne proti sulfonamidom, tetrahidrofolne kisline ne sintetizirajo več same, pač pa jo prevzemajo iz okolja) (3c, 4b, 37, 39).

### 1.3.1.3 Problem odpornosti in njeno omejevanje

Pojav vedno novih bakterijskih sevov, ki izkazujejo visok nivo odpornosti, se v praksi kaže s kliničnimi in ekonomičnimi izzivi v protimikrobni terapiji, saj izgubljammo nekoč učinkovite in poceni učinkovine (penicilin in v bolnišnicah oksacilin za stafilokokne okužbe, sulfonamide za infekcije urinarnega trakta, fluorokinolone za gonorejo). Povečuje se smrtnost pri pacientih intenzivne nege zaradi povzročiteljev okužb, odpornih proti empirični terapiji prvega izbora, še bolj zaskrbljujoče pa je, da se odporni sevi, ki so bili sprva znani predvsem kot povzročitelji bolnišničnih okužb, danes vse pogosteje pojavljajo tudi v domačem okolju.

Da bi omejile pojavnost in širjenje odpornosti, so posamezne organizacije (naprimer European Antimicrobial Resistance Surveillance System) objavile seznam navodil in priporočil ravnanja s protimikrobnimi učinkovinami. Ta vključujejo predvsem nadzor

njihove porabe tako pri ljudeh kot pri živalih in v živilski industriji ter omejevanje njihove pretirane in nenamenske uporabe z izboljšanjem diagnostike in smotrnejšo uporabo v smislu izogibanja dolgotrajnemu zdravljenju s premajhnimi odmerki, kombinirane uporabe protimikrobnih učinkovin in rotacije oziroma kolobarjenja med njimi. Ker pa odpornost ni akuten problem, pač pa gre za "kronično" bolezen, je edina prava rešitev iskanje novih protimikrobnih učinkovin, ki bi delovale na zaenkrat še neizkoriščena prijemališča v bakteriji (32, 40).

### **1.3.2 Nove protimikrobne učinkovine**

V zadnjih 30 letih razvoj protimikrobnih učinkovin stagnira, kljub temu pa so na tržišče prišle ali pa so v razvoju nekatere obetavne nove učinkovine, ki delujejo predvsem na  $G^+$  bakterije (linezolid, daptomicin...). Zaskrbljujoče pa je, da zaenkrat ni niti v fazi I kliničnih raziskav nobene učinkovine, ki bi razen na  $G^+$  bakterije delovala tudi na  $G^-$  bakterije, z izjemo tigeciklina (32, 1).

#### **1.3.2.1 Bakterijska celična stena kot tarčno mesto za protimikrobne učinkovine**

Za preživetje bakterijske celice je celična stena nujna. Kakršnakoli motnja v biosintezi njene najpomembnejše sestavine, peptidoglikana, lahko vodi v lizo celice, zato peptidoglikan predstavlja eno izmed najpogostejših tarč za delovanje že znanih protimikrobnih učinkovin.  $\beta$ -Laktamski antibiotiki preprečujejo prečno premreženje oziroma transpeptidacijo peptidoglikana z vezavo na penicilin-vezavni protein, glikopeptidni antibiotiki onemogočajo transglikozilacijo z vezavo na D-alanil-D-alanin terminalni del nastajajoče peptidoglikanske verige, bacitracin preprečuje regeneracijo lipidnega prenašalca undekaprenil-fosfata, cikloserin inhibira alanin-racemazo in D-alanin-sintetazo, fosfomicin pa kot edini doslej klinično uporaben inhibitor encimov Mur kompetitivno kot analog fosfoenolpiruvata inhibira MurA tako, da se kovalentno veže na cisteinski ostanek encima.

Vse te učinkovine inhibirajo zgolj kasnejše korake v biosintezi peptidoglikana, medtem ko zgodnejši ostajajo neizkoriščeni. Zadnje čase v svetu intenzivno raziskujejo predvsem znotrajcelične biosintezne stopnje peptidoglikana. Biosinteza UDP-*N*-acetilglukozamina s pomočjo družine encimov Glm pri bakterijah sicer poteka po drugačni poti kot pri

evkariontih in bi kot taka lahko predstavljala primerno tarčo novih protibakterijskih učinkovin, vendar pa so trenutno zanimivejši encimi družine Mur ter razvoj njihovih potencialnih inhibitorjev (4b, 5, 9, 10, 11, 41).

### 1.3.2.2 Inhibitorji ligaz Mur

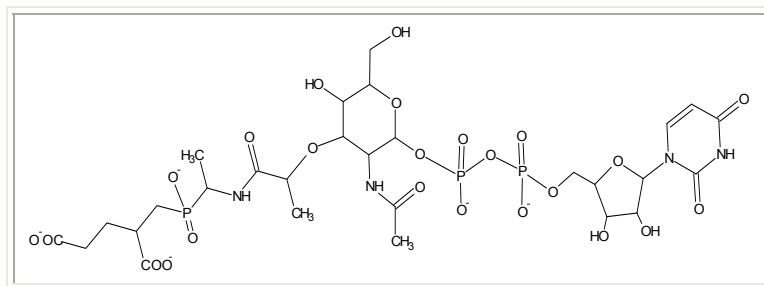
Ligaze Mur so potencialne tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Raziskave bakterijske genomike so potrdile, da so geni od *murA* do *murF*, ki kodirajo zanje, nujni za obstoj bakterije, hkrati pa ugotavljamo visoko ohranjenost encimov Mur med različnimi bakterijskimi vrstami. To pomeni, da bi Mur inhibitor pričakovano izkazoval baktericidni učinek in širok spekter delovanja. Poleg tega ligaze Mur najdemo le pri bakterijah, kar reši problem selektivne toksičnosti. Znano je tudi, da vsi encimi Mur kot substrat vežejo molekulo z enakim strukturnim elementom, UDP-*N*-acetilmuramilno skupino, iz česa sklepamo, da bi Mur inhibitor zaviral delovanje večih encimov Mur in bil tako učinkovitejši in manj podvržen pojavu bakterijske odpornosti.

V literaturi je že opisanih nekaj inhibitorjev ligaz Mur, vendar pa bodisi zaradi slabe protibakterijske učinkovitosti bodisi zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti, kot so absorpcija, porazdelitev, metabolizem in eliminacija, še nobeden izmed njih ni prišel v klinično uporabo. Problem večine je, da svoj inhibitorski učinek izkazujejo zgolj na izoliranih encimih, na celotno bakterijo pa nimajo učinka. Pri hidrofilnih spojinah je vzrok za to predvsem v slabem prehajanju celične membrane in s tem nedosegljivost tarče, saj prva faza biosinteze peptidoglikana poteka v citoplazmi. Pri lipofilnih spojinah, ki v bakterijsko celico vstopajo z difuzijo, se pri mnogih bakterijskih sevih pojavi problem odstranjevanja spojine s povratno črpalko, pri  $G^-$  bakterijah pa dodatno oviro predstavlja še zunanja membrana. V vseh primerih spojina v bakterijski celici ne doseže dovolj visokih koncentracij za inhibitorski učinek (8, 10, 11, 41).

#### 1.3.2.2.1 Peptidni inhibitorji ligaz Mur

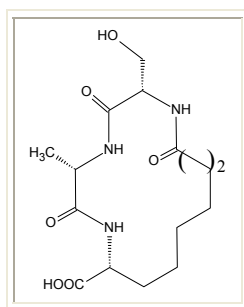
Najbolj razširjeni in najaktivnejši poznani inhibitorji ligaz Mur so fosfinatni inhibitorji, to so peptidni derivati ustrezno substituirane fosfinske kisline, ki spadajo med analoge prehodnega stanja. Delujejo tako, da med hidrolizo ATP encim ligaza Mur prenese  $\gamma$ -fosfatno skupino iz ATP na fosfinatni anion inhibitorja, nastala fosfinska skupina inhibitorja pa posnema tetraedrični intermediat, ki sicer nastaja pri reakcijah, kataliziranih

z ligazami Mur. Med fosfinatnimi inhibitorji sta najaktivnejši spojini z UDP segmentom, preko muraminske strukture povezanim s peptidnim delom, ki je pri testiranju na izoliranem encimu MurD dosegla  $IC_{50}$  pod 1 nM in podobna spojina s strukturnim fragmentom *des*-metilmuraminska kislina, ki je na MurC dosegla  $IC_{50}$  49 nM, kljub temu pa ni izkazala protimikrobne učinkovitosti (Slika 12). Sintetiziranih je bilo tudi nekaj fosfinatnih inhibitorjev MurE in MurF, vendar niso pokazali izrazitega učinka.



**Slika 12:** Struktura fosfinatnega inhibitorja MurD.

S pomočjo molekulskega modeliranja so sintetizirali serijo makrocikličnih MurD inhibitorjev, ki se vežejo v hidrofilni žep aktivnega mesta, ki ga naravni substrat UDP-*N*-acetilmuramil-L-alanin ne zavzame. Najaktivnejši med njimi je pri testiranju na izoliranem encimu dosegel  $IC_{50}$  0,7  $\mu$ M (Slika 13).

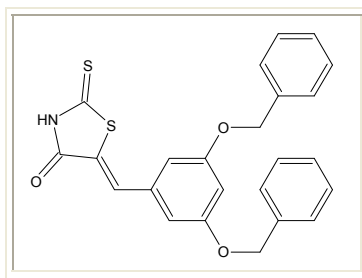


**Slika 13:** Struktura makrocikličnega inhibitorja MurD.

Znanih je nekaj aminokislinskih analogov s šibkim inhibitornim učinkom na ligaze Mur, inhibitorni učinek pa so pokazali tudi nekateri peptidni izolati iz *P. aeruginosa* (najaktivnejši je na MurC dosegel  $IC_{50}$  0,9  $\mu$ M) (10, 11, 42, 43).

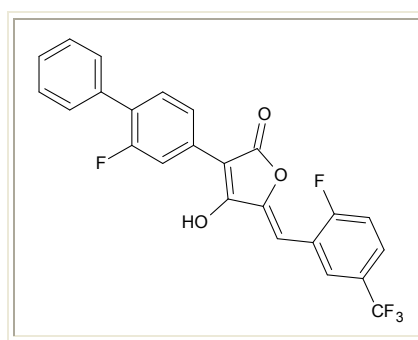
### 1.3.2.2 Nizkomolekularni nepeptidni inhibitorji ligaz Mur

Med nizkomolekularnimi nepeptidnimi spojinami so najaktivnejši benziliden rodanini (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-oni), vendar večinoma le tisti, ki nimajo substituirane kisle NH skupine na rodaninu, saj je le-ta verjetno pomembna za tvorbo vodikovih vezi v aktivnem mestu. Najaktivnejši med njimi je pri testiranju na izoliranem encimu MurC dosegel  $IC_{50}$  12  $\mu$ M in je učinkoval tudi na sev MRSA, vendar pa je bil toksičen za CHO (Chinese hamster ovary) celice (Slika 14).



**Slika 14:** Struktura benziliden-rodaninskega (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-onskega) inhibitorja MurC.

Dekarboksilirani analogi pulvinske kisline, pulvinoni, imajo inhibitorno aktivnost na encime MurA, MurB, MurC in MurD. Učinkujejo tudi na seve MRSA, VRE in PRSP, najaktivnejši med njimi pa je pri testiranju na izoliranih encimih dosegel  $IC_{50}$  na MurC 2  $\mu$ M in na MurD 6  $\mu$ M (Slika 15).



**Slika 15:** Struktura pulvinskega inhibitorja MurC in MurD.

Derivati 2-fenil-5,6-dihidro-2*H*-tieno[3,2-*c*]pirazol-3-ola izkazujejo inhibitorni učinek na MurB, MurC in MurD. Najučinkovitejši med njimi so dosegli protimikrobni učinek z MIK vrednostmi v intervalu od 0,25 do 0,32  $\mu$ g/ml na  $G^+$  bakterije vključno s sevi MRSA, VRE in PRSP. Žal pa imajo veliko afiniteto do plazemskih proteinov, saj se je MIK v prisotnosti 4% albuminov iz govejega seruma zvišal na več kot 128  $\mu$ g/mL.

Sintetizirali so še serijo sulfonohidrazidnih derivatov, ki so dualni inhibitorji MurC in MurD. Najaktivnejši med njimi so pri testiranju na izoliranih encimih dosegli  $IC_{50}$  okoli 30  $\mu$ M. Znanih je tudi nekaj UDP-substratnih analogov z inhibitornim učinkom, kot inhibitor MurF pa je bila razvita spojina ATP-PCP, ki je analog ATP, nezmožen hidrolize (10, 11, 44, 45, 46).

### **1.3.3 Vrednotenje učinkovitosti protimikrobnih učinkovin**

Kot pri vseh ostalih učinkovinah tudi učinkovitost novega protimikrobnega sredstva najprej preizkušamo *in vitro*, šele nato sledijo *in vivo* raziskave, kjer preiskujemo posamezne organe okužene in z novo učinkovino zdravljene poskusne živali na prisotnost mikroorganizmov in spremljamo njen imunski odziv.

Občutljivost in po drugi strani odpornost posameznega bakterijskega seva proti protimikrobni učinkovini *in vitro* določamo z antibiogramom, metoda pa je lahko kvalitativnega ali kvantitativnega tipa. Koncentracije protimikrobne učinkovine, izbor testnih bakterijskih sevov, postopki izvedbe antibiograma in interpretacija rezultatov so opredeljeni v mednarodnih standardih, večina držav, ki lastnih standardov nima izoblikovanih, pa upošteva priporočila CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, ZDA).

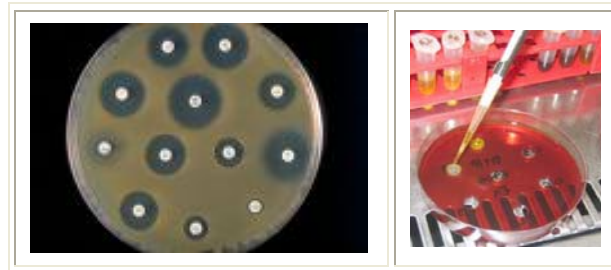
#### **1.3.3.1 Kvalitativne metode**

S temi metodami samo kvalitativno določimo, za katere protimikrobne učinkovine je posamezni bakterijski sev občutljiv oziroma opredelimo spekter delovanja protimikrobne učinkovine.

##### **1.3.3.1.1 Difuzijski antibiogram v agarju**

Površino trdnega gojišča inokuliramo s testnim bakterijskim sevom in nanj položimo standardiziran papirnat disk, prepojen s protimikrobno učinkovino znane koncentracije (disk-difuzijska metoda oziroma Kirby-Bauerjev test) ali pa v agar oblikujemo luknjico, v katero nanese protimikrobno učinkovino znane koncentracije (difuzijska metoda z luknjicami) (Slika 16). Učinkovina med inkubacijo difundira v gojišče, njena koncentracija pa logaritemsko pada z naraščajočo razdaljo od diska oziroma luknjice, tako da v

odvisnosti od koncentracije učinkovine in občutljivosti testnega seva nastane inhibicijska cona ali zaviralni pas, kjer ni bakterijske rasti. Rezultate ovrednotimo tako, da izmerimo premer zaviralnega pasu okoli diska oziroma luknjice, ga primerjamo s standardno vrednostjo in opredelimo testni bakterijski sev kot občutljiv (S - senzitiven), zmerno občutljiv (I - intermediaren) ali odporen (R – rezistenzen) proti protimikrobni učinkovini (2c, 3c, 4b, 47, 48).



**Slika 16:** Disk-difuzijska metoda (levo) in difuzijska metoda z luknjicami (desno).

### 1.3.3.2 Kvantitativne metode

S kvantitativnimi metodami določimo, v kolikšni meri je bakterijski sev občutljiv za protimikrobno učinkovino oziroma v kakšnih koncentracijah protimikrobna učinkovina pokaže učinek. Določamo MIK (minimalno inhibitorno koncentracijo), ki je najnižja koncentracija učinkovine, ki popolnoma ali skoraj popolnoma ustavi razmnoževanje in rast bakterij in MBK (minimalno baktericidno koncentracijo), ki je najnižja koncentracija učinkovine, ki uniči vse (ali po nekaterih literaturnih podatkih 99,9%) bakterije. MIK večine klinično uporabnih protimikrobnih učinkovin ne preseže vrednosti 8  $\mu\text{g/mL}$ , MBK pa je običajno višji kot MIK.

#### 1.3.3.2.1 Dilucijski antibiogram

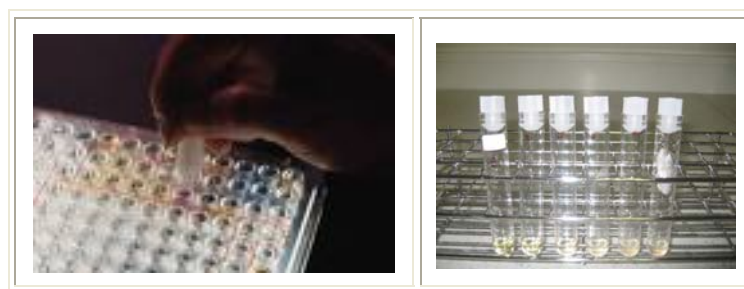
Z metodo dilucijskega antibiograma s pomočjo serijskih redčitev protimikrobne učinkovine določamo MIK v tekočem ali MBK na trdnem gojišču.

#### Dilucijski antibiogram v tekočem gojišču

V serijo s tekočim gojiščem redčene protimikrobne učinkovine z znanimi padajočimi koncentracijami dodamo inokulum testnega bakterijskega seva in po inkubaciji ovrednotimo MIK kot koncentracijo učinkovine v zadnji razredčini (z najnižjo koncentracijo učinkovine), kjer ne zaznamo bakterijske rasti. Metoda je lahko



mikrodilucijskega tipa, kjer uporabljamo mikrotitrne ploščice z vdolbinicami in manjše volumne, rezultate pa ovrednotimo z merjenjem fizikalno-kemijskih lastnosti (absorbance, optične gostote, fluorescence, luminiscence), ali makrodilucijska, kjer uporabljamo epruvete in večje volumne, rezultate pa ovrednotimo vizualno z opazovanjem bistrosti oziroma motnosti gojišča (Slika 17). Če s testnim bakterijskim sevom inokulirane razredčine protimikrobne učinkovine inkubiramo dlje časa, medtem pa po različnih časovnih intervalih odvezemamo vzorce in v njih spremljamo bakterijsko rast, lahko izrišemo inhibicijske krivulje.



**Slika 17:** Mikrodilucijska (levo) in makrodilucijska metoda (desno) v tekočem gojišču.

Metoda dilucijskega antibiograma v tekočem gojišču ne razlikuje med bakteriostatičnim in baktericidnim učinkom, kljub temu pa nam dodatno testiranje omogoča še določitev MBK. Vse razredčine protimikrobne učinkovine, kjer ne pride do bakterijske rasti, precepimo na trdno gojišče in po inkubaciji ovrednotimo MBK kot koncentracijo učinkovine v zadnji razredčini (z najnižjo koncentracijo učinkovine), ki uniči vse (ali po nekaterih literaturnih podatkih 99,9%) bakterije (na trdnem gojišču ne zraste nobena bakterijska kolonija).

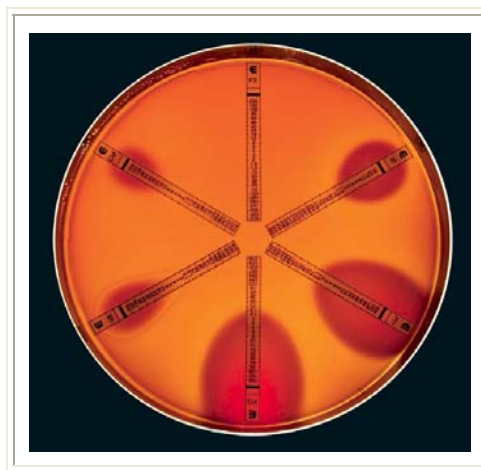
### **Dilucijski antibiogram v agarju**

Agar-dilucijsko gojišče je gojišče, ki ima že vgrajeno protimikrobno učinkovino v določeni znani koncentraciji, ki zavira rast nekaterih mikroorganizmov. Nanj nanese inokulum testnega bakterijskega seva in po inkubaciji rezultate opredelimo kot prisotnost oziroma odsotnost bakterijske rasti na mestu nanosa inokuluma (2c, 3c, 4b, 47, 48, 49).

#### **1.3.3.2.2 E-test (metoda difuzijskega gradienta)**

E-test je kombinacija difuzijske in dilucijske metode. Gre za tanko inertno membrano v obliki traku, prepojeno z rastočimi koncentracijami protimikrobne učinkovine v obliki

zveznega gradienta, ki jo položimo na površino s testnim bakterijskim sevom inokuliranega trdnega gojišča. Učinkovina med inkubacijo difundira v gojišče, v odvisnosti od njene koncentracije in občutljivosti testnega seva pa okoli traku nastane simetrična zaviralna elipsa. MIK odčitamo na mestu, kjer zaviralna elipsa seka E-test (Slika 18) (2c, 3c, 4b, 48).



**Slika 18:** E-test z zaviralno elipso.

## 2 NAMEN DELA

Seriji sedemindvajsetih spojin, načrtovanih kot inhibitorji ligaz Mur z različnimi strukturnimi lastnostmi in z večinoma že testirano inhibitorno aktivnostjo na izoliranih ligazah Mur, bomo ovrednotili protimikrobno učinkovitost na standardnih bakterijskih sevih zbirke ATCC v obliki vrednosti MIK in MBK.

Vsakemu potencialnemu inhibitorju ligaz Mur bomo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu določili MIK na dveh  $G^+$  (*S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212) in dveh  $G^-$  (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) standardnih bakterijskih sevih. V primeru učinka na katerem od standardnih sevov bomo z dodatnim testiranjem s precepljanjem na trdno gojišče določili še MBK spojine na istem sevu. Na standardni sev *S. aureus* ATCC 29213 najučinkovitejšim spojinam bomo z isto metodo ovrednotili še učinkovitost na dodatni standardni bakterijski sev *S. aureus* ATCC 43300 (sev MRSA).

Potencialnim inhibitorjem ligaz Mur, ki bodo najučinkovitejši na  $G^+$  bakterijske seve, bomo z metodo dilucijskega antibiograma v agarju določili MBK še na dveh dodatnih  $G^+$  standardnih sevih (*S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. pyogenes* ATCC 19615).

Dobljene rezultate bomo primerjali z rezultati testiranj na izoliranih ligazah Mur, hkrati pa bomo kvalitativno (spekter delovanja) in kvantitativno (MIK, MBK) primerjali učinkovitost inhibitorjev ligaz Mur glede na strukturne podobnosti in razlike znotraj in med posameznimi strukturnimi skupinami.

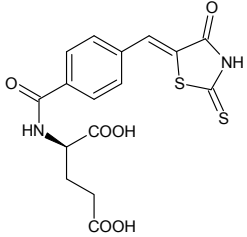
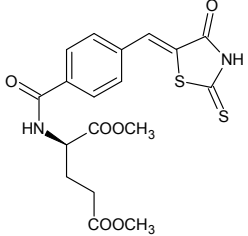
Rezultati bodo prispevali k razumevanju odnosa med strukturo in delovanjem protibakterijskih učinkovin ter nam dali iztočnice za nadaljno načrtovanje inhibitorjev ligaz Mur.

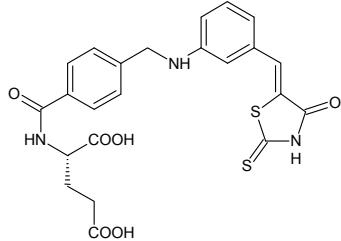
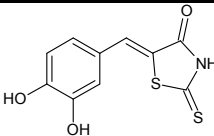
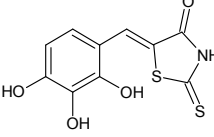
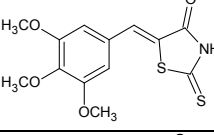
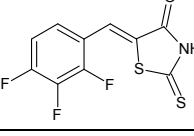
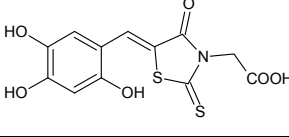
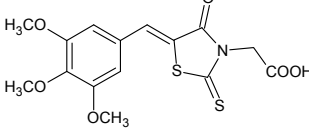
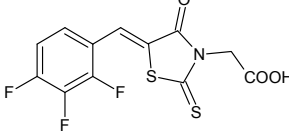
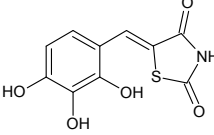
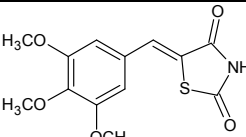
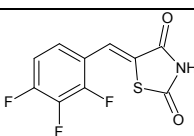
## 3 MATERIALI IN METODE

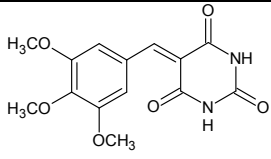
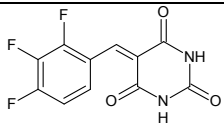
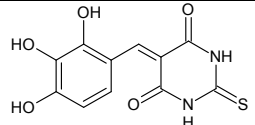
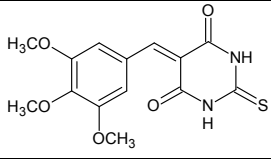
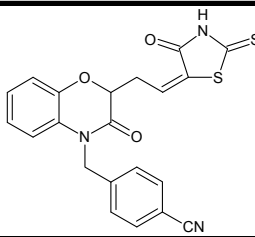
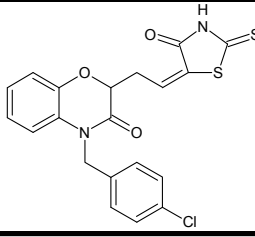
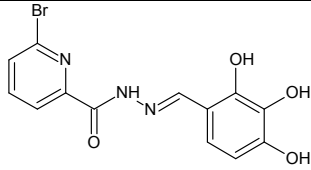
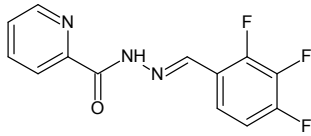
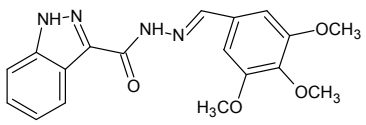
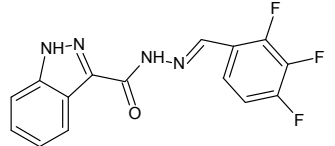
### 3.1 POTENCIALNI INHIBITORJI LIGAZ MUR

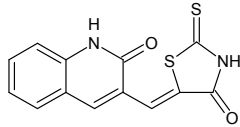
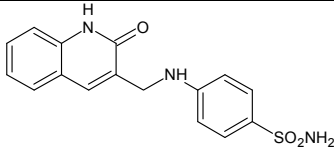
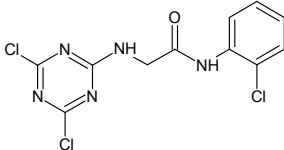
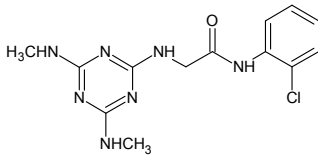
Na Fakulteti za farmacijo so sintetizirali serijo spojin, načrtovanih kot inhibitorji ligaz Mur. Sedemindvajset takih spojin smo razvrstili v osem skupin glede na njihove strukturne značilnosti (Preglednica I). Večini spojin so predhodno že ovrednotili inhibitorno aktivnost na izoliranih ligazah Mur s pomočjo ugotavljanja encimske aktivnosti z dvema različnima metodama: kolorimetrično metodo z malahitno zelenim in metodo z radioaktivno označenimi substrati. Inhibitorna aktivnost je bila izražena z rezidualno aktivnostjo (RA), ki je v odstotkih predstavljala razmerje med aktivnostjo ligaze Mur v prisotnosti potencialnega inhibitorja in aktivnostjo ligaze Mur brez prisotnosti potencialnega inhibitorja ali pa s srednjo inhibitorno koncentracijo ( $IC_{50}$ ), ki je predstavljala koncentracijo potencialnega inhibitorja v  $\mu\text{M}$ , pri kateri je RA ligaze Mur 50%. Manjša RA vrednost pomeni, da spojina pri dani koncentraciji upočasni encimsko katalizirano reakcijo. Razlike v RA so znotraj vrednosti eksperimentalnih napak, če so v mejah med 80 in 120% (50).

**Preglednica I:** Testne spojine in njihova inhibitorna aktivnost na izoliranih ligazah Mur.

OZNAKA	STRUKTURA	Mr [g/mol]	c [ $\mu\text{M}$ ]	RA [%] in/ali $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]			
				MurC	MurD	MurE	MurF
<b>A: Derivati D-GLUTAMINSKE KISLINE</b>							
1		394,03	250	NP	$IC_{50} = 45 \mu\text{M}$	96	NP
2		422,08	250	NP	94	101	NP

3	<b>DVR-40</b>		499,57	250	78	IC <sub>50</sub> = 174 μM	96	79	
<b>B: Derivati BENZILIDEN RODANINA (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona)</b>									
4	<b>TT-111</b>		253,30	100	NP	NP	86	NP	
5	<b>TT-98</b>		268,98	100	6	IC <sub>50</sub> = 6 μM	19	2	6
6	<b>LKV-16</b>		311,38	100	98	92	104	NP	
7	<b>TT-114</b>		275,27	100	81	94	91	NP	
8	<b>LKV-04</b>		327,33	100	NP	54	7	IC <sub>50</sub> = 6 μM	
9	<b>LKV-02</b>		369,41	100	NP	NP	100	NP	
10	<b>LKV-05</b>		333,31	100	NP	NP	92	NP	
<b>C: Derivati BENZILIDEN-1,3-TIAZOLIDIN-2,4-DIONA</b>									
11	<b>TT-107</b>		253,23	100	15	16,5	7	13	
12	<b>LKV-14</b>		295,31	100	NP	NP	92	NP	
13	<b>TT-113</b>		259,20	100	NP	NP	92	NP	

D: Derivati BENZILIDEN BARBITURNE KISLINE (benziliden-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-pirimidin-triona) IN BENZILIDEN TIOBARBITURNE KISLINE (benziliden-2-tiookso-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-pirimidin-diona)								
14	<b>KNZ-152</b>		306,27	100	NP	NP	NP	NP
15	<b>KNZ-153b</b>		270,16	100	NP	NP	NP	NP
16	<b>KNZ-158b</b>		280,26	100	NP	88	NP	80
17	<b>KNZ-156</b>		322,34	100	NP	NP	NP	NP
E: Derivati 2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-3(4 <i>H</i> )-ONA								
18	<b>KNZ-64b</b>		421,49	100	NP	36,8	79,6	NP
19	<b>KNZ-66-2</b>		430,93	100	NP	35,9	12,4	NP
F: Derivati ACIL-HIDRAZONOV								
20	<b>DVR-74</b>		352,14	100	NP	NP	14	21
21	<b>DVR-102</b>		279,22	500	NP	NP	100	NP
22	<b>DVR-91</b>		354,36	100	NP	NP	94	NP
23	<b>DVR-84</b>		318,25	100	NP	NP	67	27

G: Derivati 2(1H)-KINOLINONA								
24	TT-77		288,34	100	NP	NP	NP	NP
25	TT-64		329,37	500	NP	95	NP	NP
H: Derivati TRIAZINA								
26	LKV-36		332,57	100	NP	NP	NP	NP
27	LKV-42		321,76	500	NP	92	NP	NP

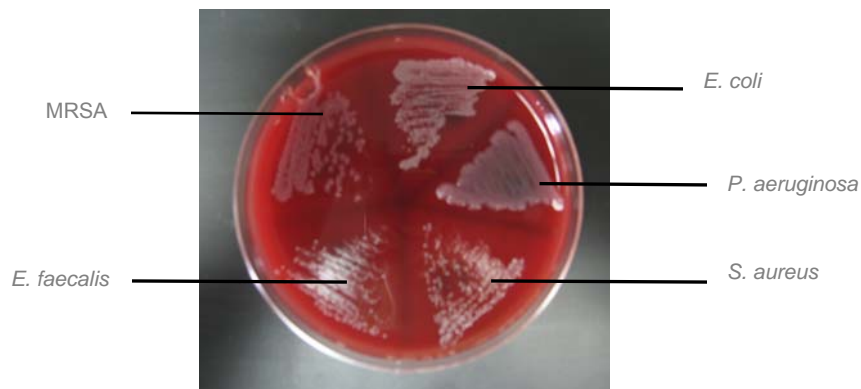
**Legenda:** Mr – relativna molekulska masa, c – molarna koncentracija spojine pri testiranju na izoliranih ligazah Mur, RA – rezidualna aktivnost, IC<sub>50</sub> – srednja inhibitorna koncentracija, NP – ni podatka.

Spojine smo za izvedbo metode makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu dobili v obliki raztopine v DMSO s koncentracijo 2 mg/mL, za izvedbo metode dilucijskega antibiograma v agarju pa v obliki štirih raztopin v DMSO s koncentracijami 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL in 0,5 mg/mL.

### 3.2 STANDARDNI BAKTERIJSKI SEVI

Za vrednotenje protibakterijske učinkovitosti smo uporabljali standardne oziroma referenčne bakterijske seve iz zbirke ATCC (American Type Culture Collection). ATCC je neodvisen neprofiten biološki raziskovalni center, ki kultivira in distribuira avtentične mikroorganizme in celične linije (51). Učinek spojin smo vrednotili na petih G<sup>+</sup> standardnih bakterijskih sevih (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. pyogenes* ATCC 19615) in dveh G<sup>-</sup> standardnih bakterijskih sevih (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Za vsak standardni bakterijski sev smo najprej pripravili čisto kulturo na KA, ki smo jo hranili v hladilniku, iz nje pa smo tedensko na KA precepljali sveže delovne kulture za izvedbo antibiogramov (Slika 19).



**Slika 19:** Bakterijske kulture s kolonijami standardnih bakterijskih sevov na KA.

### 3.3 OPREMA

- ❖ Zamrzovalnik s T -20 °C (Gorenje).
- ❖ Hladilnik s T 5 °C (LTH).
- ❖ Termostat za aerobno inkubacijo s T 35 do 37 °C (LTH).
- ❖ Inkubator s 5% CO<sub>2</sub> atmosfero s T 35 do 37 °C (Heraeus).
- ❖ Plinski gorilnik (TLOS).
- ❖ Denzitometer (Becton Dickinson).
- ❖ Stresalnik (Tehtnica).
- ❖ Sterilne platenke s pokrovčki, 50 mL (Greiner Bio-One GmbH).
- ❖ Sterilne plastične epruvete s pokrovčki, 10 mL (San.ko.m).
- ❖ Avtomatske pipete s sterilnimi nastavki, 1000 µL, 500 µL, 50 µL (Nichiryo, Finnpiipete).
- ❖ Sterilne steklene merilne pipete, 5 mL, 10 mL (TPP®).
- ❖ Sterilne plastične kapalke, 3 mL (Sarstedt).
- ❖ Sterilni membranski filtri z velikostjo por 0,22 µm, brizge (Sartorius).
- ❖ Bakteriološke cepilne zanke.
- ❖ Sterilni bombažni brisi.



## 3.4 METODE

Pri pripravi mikrobioloških gojišč in dodatkov smo se opirali na predpise Splošnih operativnih postopkov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pri izvajanju metod pa na priporočila CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, ZDA) (52, 53, 54).

### 3.4.1 Metoda makrodilucijskega antibiograma v Mueller Hinton bujonu

Z metodo makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu smo vsakemu potencialnemu inhibitorju ligaz Mur vrednotili učinkovitost v obliki vrednosti MIK na štirih standardnih bakterijskih sevih (*S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853). Najprej smo testirali štiri najvišje koncentracije spojine (128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL), če se je pri njih pokazal učinek, pa še deset nižjih koncentracij (8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,063 µg/mL, 0,031 µg/mL, 0,016 µg/mL). V primeru učinka na katerem od standardnih bakterijskih sevov smo z dodatnim testiranjem vrednotili še učinkovitost v obliki vrednosti MBK na istem sevu. Povsod, kjer se je pokazal učinek, smo testiranje ponovili (1. test, 2. test, 3. test, 4. test).

V primeru učinka na standardni bakterijski sev *S. aureus* ATCC 29213 smo potencialnemu inhibitorju ligaz Mur z isto metodo ovrednotili še učinek na dodatni standardni bakterijski sev *S. aureus* ATCC 43300 (sev MRSA). Pred izvedbo testiranja smo testnemu sevu določili odpornost proti oksacilinu z metodo dilucijskega antibiograma v agarju. Ploščo trdnega agar-dilucijskega gojišča MHOX z vgrajenim oksacilinom smo inokulirali s suspenzijo bakterijskih kolonij in po aerobni inkubaciji 18 do 24 ur pri T 35 do 37 °C preverjali, ali je bila bakterijska rast prisotna. Tako smo dokazovali, da gre res za sev MRSA, ki je odporen proti oksacilinu in raste kljub njegovi prisotnosti v gojišču.

#### 3.4.1.1 Priprava mikrobioloških gojišč in dodatkov

##### ❖ Priprava tekočega gojišča Mueller Hinton bujon (MHB)

V 1 L destilirane vode smo raztopili 22 g dehidriranega osnovnega medija Mueller Hinton bujon (Becton Dickinson), ki vsebuje goveji ekstrakt (3 g), kisli hidrolizat kazeina (17,5 g)

in škrob (1,5 g). Dobljeno raztopino smo nalili v stekleničke po 100 mL in avtoklavirali 15 minut pri T 121 °C. MHB je primeren za kultivacijo širokega spektra mikroorganizmov in za pripravo bakterijskih inokulumov.

#### ❖ **Priprava trdnega gojišča Krvni agar (KA)**

V 1 L destilirane vode smo raztopili 40 g dehidriranega osnovnega medija Blood Agar Base (Merck), ki vsebuje ekstrakt govejega srca (20 g), NaCl (5 g) in agar (15 g). Dobljeno raztopino smo avtoklavirali 15 minut pri T 121 °C, ohladili na 48 do 50 °C, aseptično dodali 50 mL citrirane goveje krvi, dobro premešali in razlili v petrijeve posode. KA je splošno uporabno gojišče za gojenje številnih klinično pomembnih mikroorganizmov, ker pokaže različno morfologijo, pigmentacijo in hemolizo.

#### ❖ **Priprava trdnega gojišča Mueller Hinton-oxacillin agar (MHOX)**

V 990 mL destilirane vode smo raztopili 38 g dehidriranega osnovnega medija Mueller Hinton II Agar (Becton Dickinson), ki vsebuje goveji ekstrakt (2 g), kisli hidrolizat kazeina (17,5 g), škrob (1,5 g) in agar (17 g) ter 40 g NaCl (Merck). Dobljeno raztopino smo avtoklavirali 15 minut pri T 121 °C in ohladili na 48 do 50 °C. Nato smo aseptično dodali 0,006 g oksacilina (Sigma), suspendiranega v 10 mL destilirane vode in steriliziranega s filtracijo skozi sterilni membranski filter z velikostjo por 0,22 µm, dobro premešali in razlili v petrijeve posode. MHOX gojišče se uporablja za identifikacijo proti meticilinu/nafcilinu/oksacilinu odpornih stafilokokov (sev MRSA).

#### ❖ **Priprava fiziološke raztopine (FR 0,85%)**

V 1 L destilirane vode smo raztopili 8,5 g NaCl (Merck), raztopino avtomatsko razlivali v steklene epruvete po 9 mL in jih avtoklavirali 15 minut pri T 121 °C.

### 3.4.1.2 Priprava razredčin potencialnega inhibitorja ligaz Mur

5 mL raztopine potencialnega inhibitorja ligaz Mur v DMSO s koncentracijo 2 mg/mL smo sterilno redčili s 34 mL MH bujona, tako da smo dobili osnovno raztopino potencialnega inhibitorja ligaz Mur s koncentracijo 256 µg/mL. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo skozi sterilni membranski filter z velikostjo por 0,22 µm in jo uporabili kot izhodišče za pripravo serije raztopin spojine s štirimi (ali štirinajstimi) zaporednimi padajočimi koncentracijami.

Ob prižganem gorilniku smo v 50 mL plastenko sterilno odpipetirali ustrezna volumna osnovne raztopine potencialnega inhibitorja ligaz Mur in MH bujona, zamašili in dobro premešali. Ker se je ob dodatku bakterijskega inokuluma v nadaljnjem postopku koncentracija spremenila, smo pri redčenju upoštevali tudi to (Preglednica II). Ko razredčin nismo več potrebovali, smo jih zamrznili in jih v primeru ponovnega testiranja spet odmrznili.

**Preglednica II:** Način redčenja osnovne raztopine testne spojine.

	Volumen osnovne raztopine s koncentracijo n	Volumen MH bujona	Koncentracija dobljene raztopine	Končna koncentracija (po dodatku bakterijskega inokuluma)
	<b>n = 256 µg/mL</b>			
1	/	/	256 µg/mL	128 µg/mL
2	4 mL	4 mL	128 µg/mL	64 µg/mL
3	2 mL	6 mL	64 µg/mL	32 µg/mL
4	2 mL	14 mL	32 µg/mL	16 µg/mL
	<b>n = 32 µg/ml</b>			
5	4 mL	4 mL	16 µg/mL	8 µg/ml
6	2 mL	6 mL	8 µg/mL	4 µg/ml
7	2 mL	14 mL	4 µg/mL	2 µg/ml
	<b>n = 4 µg/ml</b>			
8	4 mL	4 mL	2 µg/mL	1 µg/mL
9	2 mL	6 mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
10	2 mL	14 mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL
	<b>n = 0,5 µg/ml</b>			
11	4 mL	4 mL	0,25 µg/mL	0,125 µg/mL
12	2 mL	6 mL	0,125 µg/mL	0,063 µg/mL
13	2 mL	14 mL	0,063 µg/mL	0,031 µg/mL
	<b>n = 0,063 µg/ml</b>			
14	4 mL	4 mL	0,031 µg/mL	0,016 µg/mL

### 3.4.1.3 Priprava bakterijskega inokuluma

Iz čiste kulture standardnega bakterijskega seva na KA smo najprej pripravili svežo delovno kulturo. Ob prižganem gorilniku smo s prežarjeno in ohlajeno bakteriološko zanko zajeli nekaj osamljenih bakterijskih kolonij iz primarne kulture in jih precepili na zgornjo polovico nove plošče KA. Nato smo bakteriološko zanko ponovno sterilizirali in z njo naredili nekaj izolacijskih črt preko zgornje še na spodnjo polovico gojišča, da smo bakterijske kolonije razredčili. Plošče KA smo aerobno inkubirali 18 do 24 ur pri T 35 do 37° C.

Po inkubaciji smo iz delovne kulture pripravili bakterijski inokulum. Ob prižganem gorilniku smo s sterilnim brisom zajeli nekaj osamljenih bakterijskih kolonij, jih prenesli v sterilno fiziološko raztopino in premešali na stresalniku. Dobljeno bakterijsko suspenzijo smo z dodajanjem novih kolonij s sterilnim brisom ali fiziološke raztopine s sterilno kapalko z denzitometrom standardizirali na optično gostoto 0,5 McFarlanda, kar pomeni, da je vsebovala približno 1 do 2-krat  $10^8$  bakterijskih celic oziroma CFU/mL. 100  $\mu$ L suspenzije smo ob prižganem gorilniku sterilno odpipetirali v 100 mL MH bujona in premešali. Inokulum je tako vseboval približno  $10^5$  bakterijskih celic oziroma CFU/mL.

#### 3.4.1.4 Izvedba makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Ob prižganem gorilniku smo v vrsto 10 mL sterilnih epruvet sterilno pipetirali po 500  $\mu$ L pripravljenih razredčin potencialnega inhibitorja ligaz Mur v štirih (ali štirinajstih) padajočih koncentracijah od 256  $\mu$ g/mL do 32  $\mu$ g/mL (ali od 256  $\mu$ g/mL do 0,031  $\mu$ g/mL) in po 500  $\mu$ L pripravljenega bakterijskega inokuluma, ki je vseboval približno  $10^5$  bakterijskih celic oziroma CFU/mL. Zaradi direktne inokulacije so bile končne koncentracije potencialnega inhibitorja ligaz Mur v epruvetah zdaj ustrezno nižje (od 128  $\mu$ g/mL do 16  $\mu$ g/mL ali od 128  $\mu$ g/mL do 0,016  $\mu$ g/mL), gostota bakterijskih celic pa je bila približno 5-krat  $10^4$  CFU/mL. Epruvete smo zamašili in aerobno inkubirali 18 do 24 ur pri T 35 do 37 °C.

#### Ovrednotenje rezultatov

Po inkubaciji smo v vsaki epruveti vizualno ocenili, ali je bakterijska rast bila prisotna (motno gojišče) ali ne (bistro gojišče). Na ta način smo kvantitativno ovrednotili učinek potencialnega inhibitorja ligaz Mur z vrednostjo MIK, ki smo jo določili kot koncentracijo v zadnji (najnižji) razredčini, kjer ni bilo prisotne bakterijske rasti (bistro gojišče) in jo upoštevali kot najnižjo koncentracijo potencialnega inhibitorja ligaz Mur, ki ustavi razmnoževanje in rast bakterij (Slika 20). Razredčine, pri katerih bakterijska rast ni bila dobro vidna (motnost gojišča ni bila dobro vidna), smo precepili na nove plošče KA, jih aerobno inkubirali 18 do 24 ur pri T 35 do 37 °C in šele nato ovrednotili MIK. Če je bila bakterijska rast prisotna pri vseh razredčinah potencialnega inhibitorja ligaz Mur, smo MIK ovrednotili kot večji od najvišje testirane koncentracije, to je večji od 128  $\mu$ g/mL.



**Slika 20:** Bistrost gojišča zaradi odsotnosti bakterijske rasti (levo) in motnost gojišča zaradi prisotnosti bakterijske rasti (desno).

#### 3.4.1.5 Izvedba dodatnega testiranja

Vse razredčine, v katerih ni bilo prisotne bakterijske rasti (bistro gojišče) in prvo, v kateri je bakterijska rast bila prisotna (motno gojišče), smo ob prižganem gorilniku s sterilizirano bakteriološko zanko precepili na novo ploščo KA. Plošče KA smo aerobno inkubirali 18 do 24 ur pri T 35 do 37 °C.

#### **Ovrednotenje rezultatov**

Po inkubaciji smo na vsaki plošči KA vizualno ocenili, ali je bakterijska rast bila prisotna (bakterijske kolonije so zrastle, kjer se je dalo, smo jih prešteli oziroma ocenili njihovo število) ali ne (ni zrastle nobena bakterijska kolonija). Na ta način smo kvantitativno opredelili učinek potencialnega inhibitorja ligaz Mur z vrednostjo MBK, ki smo jo določili kot koncentracijo v zadnji (najnižji) razredčini, kjer po preceptitvi na ploščo KA ni bilo prisotne bakterijske rasti (ni zrastle nobena bakterijska kolonija) in jo upoštevali kot najnižjo koncentracijo potencialnega inhibitorja ligaz Mur, ki uniči vse (ali po nekaterih literaturnih podatkih 99,9%) bakterije – baktericidni učinek. Če je bila bakterijska rast prisotna pri vseh precepljenih razredčinah ali pa dodatnega testiranja nismo izvedli, ker smo že MIK opredelili kot večji od 128 µg/mL, smo MBK ovrednotili kot večji od najvišje testirane koncentracije, to je večji od 128 µg/mL.

#### 3.4.1.6 Kontrola metode

Kontrolo metode smo izvajali pred začetkom testiranja na potencialnih inhibitorjih ligaz Mur in tudi hkrati z njim.

### ❖ Kontrola ustreznosti metode s standardnim antibiotikom

Pred začetkom testiranja smo preverili, ali bo izbrana metoda dala pravilne rezultate. Izvedli smo makrodilucijski antibiogram v MH bujonu na osnovnih standardnih bakterijskih sevih, namesto potencialnega inhibitorja ligaz Mur pa smo uporabili standardni antibiotik gentamicin (Lek). Rezultate v obliki MIK smo primerjali s standardnimi vrednostmi in ugotovili, da se ujemajo (Preglednica III) (52).

**Preglednica III:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti gentamicina v primerjavi s standardom.

Standardni sev	MIK gentamicina [ $\mu\text{g/mL}$ ]	
	STANDARD	NAŠ REZULTAT
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25-1	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	gentamicin nima učinka na <i>E. faecalis</i>	>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,25-2	0,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5	0,5

Pred potrditvijo rezultatov vrednotenja učinkovitosti vsakega potencialnega inhibitorja ligaz Mur smo takoj po inokulaciji in tudi po inkubaciji preverili ustreznost našega dela z vidika istovetnosti uporabljenega bakterijskega seva in izključitve možnosti kontaminacije.

### ❖ Precepljanje bakterijskega inokuluma na novo ploščo KA

Po inokulaciji vseh razredčin potencialnega inhibitorja ligaz Mur smo ob prižganem gorilniku uporabljen bakterijski inokulum s sterilizirano bakteriološko zanko precepili na novo ploščo KA. Plošče KA smo aerobno inkubirali 18 do 24 ur pri T 35 do 37 °C.

Po inkubaciji smo preverjali, ali so bakterijske kolonije zrastle, bile morfološko enake kolonijam iz čistih kultur istega seva in ali je bila kultura čista (prisotne so smele biti samo kolonije testnega seva). Tako smo dokazovali, da smo za pripravo bakterijskega inokuluma uporabili pravilni standardni bakterijski sev in da ga med pripravo nismo kontaminirali.

### ❖ Inkubacija bakterijskega inokuluma

Vsak preostali bakterijski inokulum smo inkubirali na enak način kot epruvete z razredčinami potencialnega inhibitorja ligaz Mur. Po inkubaciji smo preverjali, ali je bakterijska rast bila prisotna (motno gojišče). Tako smo dokazovali, da je inokulum res vseboval bakterijske kolonije, ki so brez prisotnosti potencialnega inhibitorja ligaz Mur zrastle ob pogojih inkubacije.

### ❖ Precepljanje inkubiranih inokuliranih razredčin potencialnega inhibitorja ligaz Mur

Po inkubaciji epruвет z razredčinami potencialnega inhibitorja ligaz Mur smo vsaj eno izmed razredčin, kjer je bila prisotna bakterijska rast (motno gojišče) ob prižganem gorilniku s sterilizirano bakteriološko zanko precepili na novo ploščo KA. V primeru, ko smo MIK določili kot večji od 128 µg/mL, smo precepili le razredčino s koncentracijo 128 µg/mL, v primeru, ko smo MIK določili kot manjši od 128 µg/mL, pa smo precepili vse razredčine, kjer ni bilo prisotne bakterijske rasti (bistro gojišče) in prvo razredčino (z najnižjo koncentracijo), kjer je bakterijska rast bila prisotna (motno gojišče). Plošče KA smo aerobno inkubirali 18 do 24 ur pri T 35 do 37 °C. Po inkubaciji smo preverjali, ali so bakterijske kolonije zrastle, bile morfološko enake kolonijam iz čistih kultur istega seva in ali je bila kultura čista (prisotne so smele biti samo kolonije testnega seva). Tako smo dokazovali, da smo razredčine res inokulirali, da smo za inokulacijo uporabili pravilni standardni bakterijski sev in da med izvedbo antibiograma ni prišlo do kontaminacije.

### 3.4.2 Metoda dilucijskega antibiograma v agarju

Z metodo dilucijskega antibiograma v agarju smo dvema potencialnima inhibitorjema ligaz Mur (LKV-16, TT-114), ki sta bila najučinkovitejša na G<sup>+</sup> standardni bakterijski sev *S. aureus* ATCC 29213, pokazala pa sta tudi učinek na dodatni G<sup>+</sup> standardni bakterijski sev *S. aureus* ATCC 43300 (sev MRSA), ovrednotili učinkovitost v obliki vrednosti MBK še na dveh dodatnih G<sup>+</sup> standardnih bakterijskih sevih (*S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. pyogenes* ATCC 19615). To metodo smo uporabili, ker bakterijska seva *S. pneumoniae* in *S. pyogenes* rasteta le na s krvjo obogatenih gojiščih. Testirali smo štiri koncentracije potencialnega inhibitorja ligaz Mur (128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL), vse v dvojniku (1. test, 2. test).

#### 3.4.2.1 Priprava mikrobioloških gojišč in dodatkov

##### ❖ Priprava trdnega agar-dilucijskega mikrobiološkega gojišča

Raztopine potencialnega inhibitorja ligaz Mur v DMSO s koncentracijami 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL in 0,5 mg/mL smo sterilizirali s filtracijo skozi sterilni membranski filter z velikostjo por 0,22 µm, nato pa smo jih med pripravo vgradili v trdno agar-dilucijsko gojišče.

Kot osnovo smo uporabili trdno gojišče Mueller Hinton-ovčja kri (MHovca), ki se uporablja za testiranje občutljivosti *S. pneumoniae* in drugih streptokokov za protimikrobne učinkovine. V 1 L destilirane vode smo raztopili 38 g dehidriranega osnovnega medija Mueller Hinton II Agar (BBL™, Becton Dickinson), ki vsebuje goveji ekstrakt (2 g), kisli hidrolizat kazeina (17,5 g), škrob (1,5 g) in agar (17 g). Dobljeno raztopino smo avtoklavirali 15 minut pri T 121 °C, ohladili na 48 do 50 °C, aseptično dodali 50 mL defibrinirane ovčje krvi in dobro premešali. V aseptični komori smo v petrijeve posode razlivali po 20 mL dobljene mešanice in po 0,66 mL vsake razredčine potencialnega inhibitorja ligaz Mur in dobro premešali, da smo v končnem trdnem agar-dilucijskem gojišču dobili koncentracije potencialnih inhibitorjev ligaz Mur 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL in 16 µg/mL (Preglednica IV).

**Preglednica IV:** Način priprave agar-dilucijskega gojišča z vgrajeno testno spojino.

	Volumen osnovnega gojišča	Koncentracija osnovne raztopine potencialnega inhibitorja ligaz Mur	Volumen osnovne raztopine potencialnega inhibitorja ligaz Mur	Končna koncentracija potencialnega inhibitorja ligaz Mur v gojišču
1	20 mL	4 mg/mL	0,66 mL	128 µg/mL
2	20 mL	2 mg/mL	0,66 mL	64 µg/mL
3	20 mL	1 mg/mL	0,66 mL	32 µg/mL
4	20 mL	0,5 mg/mL	0,66 mL	16 µg/mL

#### ❖ Priprava fiziološke raztopine (FR 0,85%)

V 1 L destilirane vode smo raztopili 8,5 g NaCl (Merck), raztopino avtomatsko razlivali v steklene epruvete po 9 mL in avtoklavirali 15 minut pri T 121 °C.

#### 3.4.2.2 Priprava bakterijskega inokuluma

Bakterijski inokulum smo pripravili na enak način kot za metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB. 50 µL suspenzije, ki je vsebovala približno 1 do 2-krat  $10^8$  bakterijskih celic oziroma CFU/mL, smo ob prižganem gorilniku sterilno odpipetirali v 5 mL MH bujona in premešali. Inokulum je tako vseboval približno  $10^6$  bakterijskih celic oziroma CFU/mL.



### 3.4.2.3 Izvedba dilucijskega antibiograma v agarju

Ob prižganem gorilniku smo z avtomatsko pipeto s sterilnim nastavkom nanašali pripravljen bakterijski inokulum v obliki kapljic na plošče trdnega agar-dilucijskega gojišča z vgrajenim potencialnim inhibitorjem ligaz Mur v štirih različnih koncentracijah od 128 µg/mL do 16 µg/mL. Ker je inokulum vseboval približno  $10^6$  bakterijskih celic oziroma CFU/mL, nanašali pa smo ga po 20 µL, je bilo v vsaki kapljici nanosa približno  $10^4$  bakterijskih celic oziroma CFU/mL. Inokulirane plošče smo pustili stati ob prižganem gorilniku 30 minut, da se je inokulum vpil v gojišče. Plošče smo inkubirali 18 do 24 ur pri T 35 do 37 °C v inkubatorju s 5% CO<sub>2</sub> atmosfero (optimalni pogoji za rast *S. pneumoniae* in *S. pyogenes*).

#### **Ovrednotenje rezultatov**

Po inkubaciji smo na vsaki plošči trdnega agar-dilucijskega gojišča ocenili, ali je na mestu nanosa bakterijskega inokuluma bakterijska rast bila prisotna (bakterijske kolonije so zrastle, kjer se je dalo, smo jih prešteli oziroma ocenili njihovo število) ali ne (ni zrastle nobena bakterijska kolonija). Na ta način smo kvantitativno opredelili učinek potencialnega inhibitorja ligaz Mur z vrednostjo MBK, ki smo jo določili kot zadnjo (najnižjo) koncentracijo potencialnega inhibitorja ligaz Mur, vgrajenega v ploščo trdnega agar-dilucijskega gojišča, kjer bakterijska rasti ni bila prisotna (ni zrastle nobena bakterijska kolonija) in jo upoštevali kot najnižjo koncentracijo potencialnega inhibitorja ligaz Mur, ki uniči vse (ali po nekaterih literaturnih podatkih 99,9%) bakterije - baktericidni učinek. Kjer je bila bakterijska rast prisotna pri vseh koncentracijah potencialnega inhibitorja ligaz Mur, smo MBK ovrednotili kot večji od najvišje testirane koncentracije, to je večji od 128 µg/mL.

### 3.4.2.4 Kontrola metode

Kontrolo metode smo izvajali hkrati s testiranjem na potencialnih inhibitorjih ligaz Mur.

#### **❖ Kontrola ustreznosti metode s pozitivno in negativno kontrolo**

Ali izbrana metoda daje pravilne rezultate smo preverjali s pozitivno in negativno kontrolo. Na vsako ploščo trdnega agar-dilucijskega gojišča z vgrajenim potencialnim inhibitorjem ligaz Mur smo poleg bakterijskega inokuluma testnih sevov nanesti še enako količino

enako pripravljene inokuluma seva *E. coli* ATCC 25922 kot pozitivno kontrolo in seva *S. aureus* ATCC 29213 kot negativno kontrolo. Po inkubaciji smo preverjali, ali je na mestu nanosa inokuluma pozitivne kontrole bakterijska rast bila prisotna in ali na mestu nanosa negativne kontrole bakterijska rast ni bila prisotna, ker so rezultati metode makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu že prej pokazali, da testirana potencialna inhibitorja ligaz Mur v koncentracijah od 128 µg/mL do 16 µg/mL nimata učinka na sev *E. coli* ATCC 25922, na sev *S. aureus* ATCC 29213 pa.

Pred potrditvijo rezultatov vrednotenja učinkovitosti vsakega potencialnega inhibitorja ligaz Mur smo takoj po inokulaciji in tudi po inkubaciji preverili ustreznost našega dela z vidika istovetnosti uporabljenega bakterijskega seva in izključitve možnosti kontaminacije.

#### ❖ **Precepljanje bakterijskega inokuluma na novo ploščo KA**

Kontrolo metode s precepljanjem bakterijskega inokuluma na novo ploščo KA smo izvajali na enak način kot za metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB, le da smo plošče KA inkubirali v inkubatorju s 5% CO<sub>2</sub> atmosfero.

#### ❖ **Inkubacija bakterijskega inokuluma**

Vsak preostali bakterijski inokulum smo inkubirali na enak način kot plošče trdnega agar-dilucijskega gojišča z vgrajenim potencialnim inhibitorjem ligaz Mur. Po inkubaciji smo preverjali, ali je bakterijska rast bila prisotna (motno gojišče). Tako smo dokazovali, da je inokulum res vseboval bakterijske kolonije, ki so brez prisotnosti potencialnega inhibitorja ligaz Mur zrastle ob pogojih inkubacije.

#### ❖ **Opazovanje inkubiranih inokuliranih plošč trdnega agar-dilucijskega gojišča z vgrajenim potencialnim inhibitorjem ligaz Mur**

Po inkubaciji inokuliranih plošč trdnega agar-dilucijskega gojišča z vgrajenim potencialnim inhibitorjem ligaz Mur smo zrastle bakterijske kolonije primerjali s kolonijami iz čistih kultur istega standardnega bakterijskega seva. Preverjali smo, ali so bakterijske kolonije zrastle, bile morfološko enake kolonijam iz čistih kultur istega seva in ali je bila kultura čista (prisotne so smele biti samo kolonije testnega seva). Tako smo dokazovali, da smo plošče res inokulirali in da med izvedbo antibiograma ni prišlo do kontaminacije.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 INTERPRETACIJA REZULTATOV

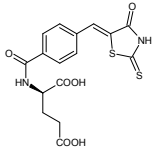
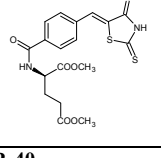
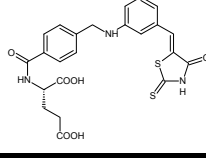
Zaradi boljše preglednosti smo rezultate vrednotenja učinkovitosti na vseh testiranih standardnih bakterijskih sevih za vsako strukturno skupino spojini zbrali v preglednici (Preglednica VI, VII, XII, XV, XVIII, XXI, XXIII, XXIV), za vsak posamezen učinkovit potencialni inhibitor ligaz Mur v posebni preglednici (Preglednica VIII, IX, X, XI, XIII, XIV, XVI, XVII, XIX, XX, XXII), za potencialne inhibitorje ligaz Mur, ki niso pokazali protibakterijskega učinka, pa v preglednicah v Prilogi (Preglednica XXV do Preglednica XXXIX). Pri tem smo uporabljali nekatere oznake (Preglednica V).

**Preglednica V:** Oznake, ki smo jih uporabljali pri interpretaciji rezultatov.

<b>Metoda makrodilucijskega antibiograma v Mueller Hinton bujonu</b>		
	<b>POMEN</b>	<b>OZNAKA</b>
<b>Določitev MIK</b>	bakterijska rast v inokulirani razredčini je bila prisotna (motno gojišče)	+
	bakterijska rast v inokulirani razredčini ni bila prisotna (bistro gojišče)	-
	bakterijska rast v inokulirani razredčini ni bila dobro vidna (motnost gojišča ni bila dobro vidna)	-+
	minimalna inhibitorna koncentracija	MIK
<b>Dodatno testiranje za določitev MBK</b>	bakterijska rast po precepitvi na KA je bila prisotna (bakterijske kolonije so zrastle, kjer je bilo možno, smo jih prešteli oziroma ocenili njihovo število)	✓ (število)
	bakterijska rast po precepitvi na KA ni bila prisotna (ni zrastle nobena bakterijska kolonija)	×
	minimalna baktericidna koncentracija	MBK
<b>Kontrola metode</b>	ustrezno	<input checked="" type="checkbox"/>
	neustrezno	<input checked="" type="checkbox"/>
<b>Metoda dilucijskega antibiograma v agarju</b>		
	<b>POMEN</b>	<b>OZNAKA</b>
<b>Določitev MBK</b>	bakterijska rast na mestu nanosa inokuluma je bila prisotna (bakterijske kolonije so zrastle, kjer je bilo možno, smo jih prešteli oziroma ocenili njihovo število)	✓ (število)
	bakterijska rast na mestu nanosa inokuluma ni bila prisotna (ni zrastle nobena bakterijska kolonija)	×
	minimalna baktericidna koncentracija	MBK
<b>Kontrola metode</b>	ustrezno	<input checked="" type="checkbox"/>
	neustrezno	<input checked="" type="checkbox"/>

## 4.2 DERIVATI D-GLUTAMINSKE KISLINE

**Preglednica VI:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti derivatov D-glutaminske kisline.

		MIK in MBK [µg/mL]	STANDARDNI SEV			
			<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	<b>TT-96</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
		MBK	>128	>128	>128	>128
2	<b>TT-89</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
		MBK	>128	>128	>128	>128
3	<b>DVR-40</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
		MBK	>128	>128	>128	>128

### 4.2.1 Spojini TT-96 in TT-89

Spojini TT-96 in TT-89 sta bili kot derivata D-glutaminske kisline načrtovani kot inhibitorja encima MurD. Spojina TT-96 je pokazala inhibitorno aktivnost na izoliranem encimu MurD ( $IC_{50}$  je 45 µM), testiranje na bakterijskih sevih pa učinkovitosti ni potrdilo. Ker je spojina zaradi dveh karboksilnih skupin D-glutaminske kisline precej hidrofilna, smo sklepali, da ne more prehajati preko bakterijske citoplazemske membrane. Testiranje smo zato izvedli še na lipofilnejšem derivatu, spojini TT-89, ki ima kot predstopnja v sintezi spojine TT-96 obe karboksilni skupini D-glutaminske kisline v obliki metilnega estra, kar naj bi izboljšalo njeno prehajanje preko bakterijske citoplazemske membrane. Po pričakovanju spojina TT-89 na izoliranih encimu MurD ni pokazala inhibitorne aktivnosti, saj mora biti karboksilna skupina D-glutaminske kisline, tako kot pri naravnem substratu encima MurD, prosta, neučinkovita pa je bila tudi pri testiranju na bakterijskih sevih.

## 4.2.2 Spojina DVR-40

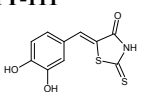
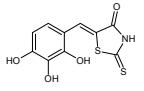
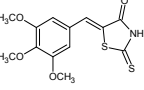
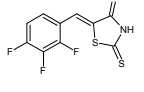
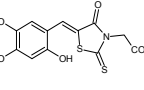
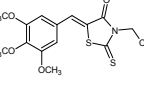
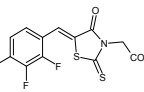
Tudi spojina DVR-40 je bila kot derivat D-glutaminske kisline načrtovana kot inhibitor encima MurD. Strukturno je podobna spojini TT-96, med benziliden rodaninsko skupino in D-glutaminsko kislino pa je še benzil-aminski distančnik. Spojina je pokazala inhibitorno aktivnost na izoliranem encimu MurD ( $IC_{50}$  je 174  $\mu$ M), testiranje na bakterijskih sevih pa učinkovitosti ni potrdilo. Podobno kot pri spojini TT-96 bi zaradi hidrofilnosti lahko prišlo do težav pri prehajanju spojine DVR-40 preko bakterijske celične membrane, zato so kasneje na izoliranem encimu MurD testirali še lipofilnejši derivat, ki je imel obe karboksilni skupini D-glutaminske kisline v obliki metilnega estra, vendar pa podobno kot spojina TT-89 ni pokazal inhibitorne aktivnosti.

## 4.2.3 Učinkovitost derivatov D-glutaminske kisline

Derivati D-glutaminske kisline so bili načrtovani kot inhibitorji encima MurD, katerega naravni substrat je D-glutaminska kislina. Nobena od testiranih spojin ni pokazala protimikrobne učinkovitosti. To ni tako presenetljivo, saj tudi vsi doslej znani analogi D-glutaminske kisline niso bili izrazito učinkoviti (11).

### 4.3 DERIVATI BENZILIDEN RODANINA (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona)

**Preglednica VII:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti derivatov benziliden rodanina (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona).

		MIK in MBK [µg/mL]	STANDARDNI SEV						
			S. aureus ATCC 29213	E. faecalis ATCC 29212	E. coli ATCC 25922	P. aeruginosa ATCC 27853	MRSA	S. pneumoniae ATCC 49619	S. pyogenes ATCC 19615
1	TT-111 	MIK	>128	>128	>128	>128			
		MBK	>128	>128	>128	>128			
2	TT-98 	MIK	>128	>128	>128	128			
		MBK	>128	>128	>128	128			
3	LKV-16 	MIK	8	>128	>128	>128	128		
		MBK	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
4	TT-114 	MIK	0,5-2	>128	>128	>128	32		
		MBK	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128
5	LKV-04 	MIK	128	128	>128	>128	128		
		MBK	>128	>128	>128	>128	>128		
6	LKV-02 	MIK	>128	>128	>128	>128			
		MBK	>128	>128	>128	>128			
7	LKV-05 	MIK	>128	>128	>128	>128			
		MBK	>128	>128	>128	>128			

#### 4.3.1 Spojina TT-111

Spojina TT-111 kot derivat katehola najbrž prehaja preko bakterijske citoplazemske membrane, saj obstajajo transportni sistemi za prehajanje kateholov v bakterijsko celico. Vendar pa spojina ni pokazala ne inhibitorne aktivnosti na izoliranih ligazah Mur, ne protimikrobne učinkovitosti na bakterijskih sevih.

### 4.3.2 Spojina TT-98

Preglednica VIII: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine TT-98.

	Standardni sev	Koncentracija spojine TT-98 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
		128	64	32	16		
1. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-+	+	+	+	>128	
	Precepitev na KA	✓	✓				>128
2. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-+	+	+	+	>128	
	Precepitev na KA	✓	✓				>128
1. test	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
	Precepitev na KA	✓					>128
2. test	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
	Precepitev na KA	✓					>128
1. test	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
	Precepitev na KA	✓					>128
2. test	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
	Precepitev na KA	✓					>128
1. test	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	+	+	128	
	Precepitev na KA	×	✓				128
2. test	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	+	+	128	
	Precepitev na KA	×	✓				128

#### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini TT-98 smo vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih (1. test). Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevih *E. faecalis* ATCC 29212 in *E. coli* ATCC 25922 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh sevih ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ . Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 pri koncentraciji 128  $\mu\text{g/mL}$  motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je do tega najbrž prišlo zaradi močne obarvanosti spojine. Po precepitvi razredčin s koncentracijama 128  $\mu\text{g/mL}$  in 64  $\mu\text{g/mL}$  smo tudi na sevu *S. aureus* ATCC 29213 MIK in MBK ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Pri sevu *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri koncentraciji 128  $\mu\text{g/mL}$  bakterijske rasti nismo zaznali, zato smo MIK ovrednotili kot 128  $\mu\text{g/mL}$ . Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *P. aeruginosa* ATCC 27853. Razredčini s koncentracijama 128  $\mu\text{g/mL}$  in 64  $\mu\text{g/mL}$  smo precepili na novi plošči KA. Po inkubaciji na plošči, kamor smo precepili razredčino s koncentracijo 128  $\mu\text{g/mL}$ , nismo zaznali bakterijske rasti, zato smo MBK ovrednotili kot 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Ker je spojina TT-98 pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur pokazala zelo dober inhibični učinek, smo testiranje ponovili (2. test), vendar smo dobili enake rezultate.

Kontrola metode:

### Učinkovitost spojine TT-98

Spojina TT-98 deluje kot nekompetitivni inhibitor ligaz Mur (na molekulo encima se veže hkrati s substratom, vendar v različno aktivno mesto, s čimer vpliva na katalitično aktivnost encima) in je pri testiranjih na izoliranih encimih pokazal odlično inhibitorno aktivnost na vse štiri ligaze Mur ( $IC_{50}$  na MurC in MurE je  $6 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  na MurD in MurF je  $2 \mu\text{M}$ ). Testiranje na bakterijskih sevih učinkovitosti ni v celoti potrdilo, saj je spojina pokazala učinek le na *P. aeruginosa*, pa še to v zelo visokih koncentracijah (MIK in MBK je  $128 \mu\text{g/mL}$ , kar za spojino TT-98 pomeni  $475,9 \mu\text{M}$ ). Ker je spojina zaradi treh hidroksilnih skupin na fenilnem obroču precej hidrofilna, smo sklepali, da ne more prehajati preko bakterijske citoplazemske membrane in smo testiranje zato izvedli še na dveh lipofilnejših derivatih (spojini LKV-16 in TT-114). Pri *P. aeruginosa*, ki je G<sup>-</sup> bakterija, pa največjo oviro za prehajanje spojine najbrž predstavlja zunanja membrana. Tako bi v nadaljnih protibakterijskih testiranjih gojišču lahko dodali katero od znanih snovi, ki s protibakterijskimi učinkovinami sinergistično delujejo tako, da povečajo prepustnost zunanje membrane. Taka snov je naprimer EDTA, ki kelira kalcijeve in magnezijeve ione v zunanji membrani in jo s tem destabilizira (8).



### 4.3.3 Spojina LKV-16

Preglednica IX: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine LKV-16.

Standardni sev		Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu														MIK [µg/mL]	MBK [µg/mL]		
		Koncentracija spojine LKV-16 [µg/mL]																	
		128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016				
1. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-													≤16	
	Precepitev na KA	√	10	100	200														>128
2. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		8	
	Precepitev na KA	40	100	100	√	√	√	√											>128
3. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		8	
	Precepitev na KA	20	√	20	√	√	√	√											>128
1. test	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+													>128	
	Precepitev na KA	√																	>128
2. test	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+													>128	
	Precepitev na KA	√																	>128
1. test	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+													>128	
	Precepitev na KA	√																	>128
1. test	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+													>128	
	Precepitev na KA	√																	>128
	MRSA	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		128	
	Precepitev na KA	√	√	√	√	√	√												>128
		Metoda dilucijskega antibiograma v agarju														MBK [µg/mL]			
		Koncentracija spojine LKV-16 [µg/mL]																	
		128	64	32	16														
1. test	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	+	+	+	+													>128	
2. test	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	+	+	+	+													>128	
1. test	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	+	+	+	+										>128				
2. test	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	+	-	+	+										>128				
	<b>Pozitivna kontrola</b> ( <i>S. aureus</i> ATCC 29213)	-	-	-	-														
	<b>Negativna kontrola</b> ( <i>E. coli</i> ATCC 25922)	+	+	+	+														

#### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini LKV-16 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB najprej vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih (1. test). Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevih *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh bakterijskih sevih ovrednotili kot večja od 128 µg/mL.

Testiranje na sevu *E. faecalis* ATCC 29212 smo ponovili (2. test), ker gre tako kot pri sevu *S. aureus* ATCC 29213, na katerega je spojina LKV-16 pokazala učinek, za G<sup>+</sup> bakterijo.

Vendar so bili rezultati enaki kot pri prvem testiranju, zato smo MIK in MBK ponovno ovrednotili kot večja od 128 µg/mL.

Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 bakterijske rasti nismo zaznali pri nobeni od koncentracij, kar nam je pokazalo, da je MIK nižji ali vsaj enak najnižji testirani koncentraciji, to je 16 µg/mL in da moramo testiranje ponoviti. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Vse razredčine smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Testiranje na sevu *S. aureus* ATCC 29213 smo ponovili še dvakrat, prvič za dokončno določitev MIK (2. test) in drugič za potrditev dobljenega rezultata (3. test). Obakrat bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL in 8 µg/mL, pri koncentraciji 4 µg/mL pa motnost gojišča ni bila dobro vidna. Po precepitvi razredčin s koncentracijami od 128 µg/mL do 2 µg/mL smo v obeh primerih končni MIK ovrednotili kot 8 µg/mL. Obakrat smo ponovili tudi dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 2 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato da smo MBK obakrat ponovno ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Zaradi dobrega učinka spojine LKV-16 na sev *S. aureus* ATCC 29213 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB vrednotili še njeno učinkovitost v vseh štirinajstih koncentracijah na dodatnem sevu MRSA. Po inkubaciji bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 128 µg/mL, 16 µg/mL in 8 µg/mL, pri vmesnih (64 µg/mL, 32 µg/mL) in nižjih (od 4 µg/mL do 0,016 µg/mL) pa. Po precepitvi razredčin s koncentracijami od 128 µg/mL do 4 µg/mL smo MIK ovrednotili kot 128 µg/mL, zaradi nekoliko nejasnih rezultatov pa je možno, da je dejanski MIK nižji ali da je prišlo do kakšne napake med izvedbo antibiograma, naprimer pri redčenju osnovne raztopine spojine z MHB. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu MRSA. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 4 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Kontrola metode:

## **Metoda dilucijskega antibiograma v agarju**

Ker je spojina LKV-16 pokazala dober učinek na sev *S. aureus* ATCC 29213, šibek učinek pa je imela tudi na sev MRSA, smo z metodo dilucijskega antibiograma v agarju vrednotili njeno učinkovitost še na dveh dodatnih G<sup>+</sup> sevih, *S. pneumoniae* ATCC 49619 in *S. pyogenes* ATCC 19615 v dvojniku (1. test, 2. test). Na mestu nanosa inokuluma smo pri obeh sevih pri vseh štirih koncentracijah zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK na obeh obakrat ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Kontrola metode:

### Učinkovitost spojine LKV-16

Spojina LKV-16 je strukturno podobna spojini TT-98, ki deluje kot nekompetitivni inhibitor ligaz Mur, je pa lipofilnejša, saj ima na fenilnem obroču namesto treh hidroksilnih tri metoksi skupine, kar naj bi izboljšalo njeno prehajanje preko bakterijske citoplazemske membrane. Testiranja na bakterijskih sevih so pokazala izboljšano učinkovitost v primerjavi s spojino TT-98, saj je spojina LKV-16 pokazala učinek na *S. aureus* in tudi na odporni sev MRSA, vendar ne tudi na *P. aeruginosa*. Na *S. aureus* smo določili MIK 8 µg/mL (to za spojino LKV-16 pomeni 25,7 µM), kar je na meji sprejemljivosti za potencialno klinično uporabnost, MIK na MRSA pa smo sicer določili 128 µg/mL, vendar je zaradi nejasnih rezultatov možno, da je nižji. Ker pa pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur ni pokazala inhibitorne aktivnosti, lahko sklepamo, da spojina LKV-16 ne učinkuje kot inhibitor ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem.

### 4.3.4 Spojina TT-114

Preglednica X: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine TT-114.

Standardni sev		Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu														MIK [µg/mL]	MBK [µg/mL]			
		Koncentracija spojine TT-114 [µg/mL]																		
		128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016					
1. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤16		
	Precepitev na KA	20	100	50	20															>128
2. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0,5		
	Precepitev na KA	8	50	15	50	✓	✓	✓	✓	✓	✓									>128
3. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2		
	Precepitev na KA	13	4	25	100	✓	1	✓	✓	✓										>128
4. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2		
	Precepitev na KA	1	29	1	8	2	21	✓	✓											>128
1. test	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+														>128	
	Precepitev na KA	✓	✓	✓																>128
2. test	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+														>128	
	Precepitev na KA	✓	✓																	>128
1. test	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+														>128	
	Precepitev na KA	✓																		>128
1. test	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+														>128	
	Precepitev na KA	✓																		>128
1. test	MRSA	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32		
	Precepitev na KA	100	100	✓	✓															>128
		Metoda dilucijskega antibiograma v agarju														MBK [µg/mL]				
		Koncentracija spojine TT-114 [µg/mL]																		
		128	64	32	16															
1. test	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	- (0)	- (0)	+	+														64	
2. test	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	- (0)	- (0)	+	+														64	
1. test	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	+	+	+	+														>128	
2. test	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	+	+	+	+														>128	
	Pozitivna kontrola ( <i>S. aureus</i> ATCC 29213)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)															
	Negativna kontrola ( <i>E. coli</i> ATCC 25922)	+	+	+	+															

#### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini TT-114 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB najprej vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih (1. test). Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevih *E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh bakterijskih sevih ovrednotili kot večja od 128 µg/mL. Pri sevu *E. faecalis* ATCC 29212 pri koncentracijah 128 µg/mL in 64 µg/mL motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je do tega najbrž prišlo zato, ker so kolonije *E. faecalis* v suspenziji zelo majhne. Po

precepitvi razredčin s koncentracijami od 128 µg/mL do 32 µg/mL smo tudi na sevu *E. faecalis* ATCC 29212 MIK in MBK ovrednotili kot večja od 128 µg/mL.

Testiranje na sevu *E. faecalis* ATCC 29212 smo ponovili (2. test), ker gre tako kot pri sevu *S. aureus* ATCC 29213, na katerega je spojina TT-114 pokazala učinek, za G<sup>+</sup> bakterijo. Pri koncentraciji 128 µg/mL motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je do tega najbrž spet prišlo zato, ker so kolonije *E. faecalis* v suspenziji zelo majhne. Po precepitvi razredčin s koncentracijama 128 µg/mL in 64 µg/mL smo MIK in MBK ponovno ovrednotili kot večja od 128 µg/mL.

Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 bakterijske rasti nismo zaznali pri nobeni od koncentracij, kar nam je pokazalo, da je MIK nižji ali vsaj enak najnižji testirani koncentraciji, to je 16 µg/mL in da moramo testiranje ponoviti. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Vse razredčine smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Testiranje na sevu *S. aureus* ATCC 29213 smo ponovili še trikrat, prvič za dokončno določitev MIK (2. test), drugič (3. test) in tretjič (4. test) pa za potrditev dobljenega rezultata. Prvič (2. test) bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL in 0,5 µg/mL, zato smo MIK ovrednotili kot 0,5 µg/mL. Ponovili smo tudi dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 0,25 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato da smo MBK ponovno ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

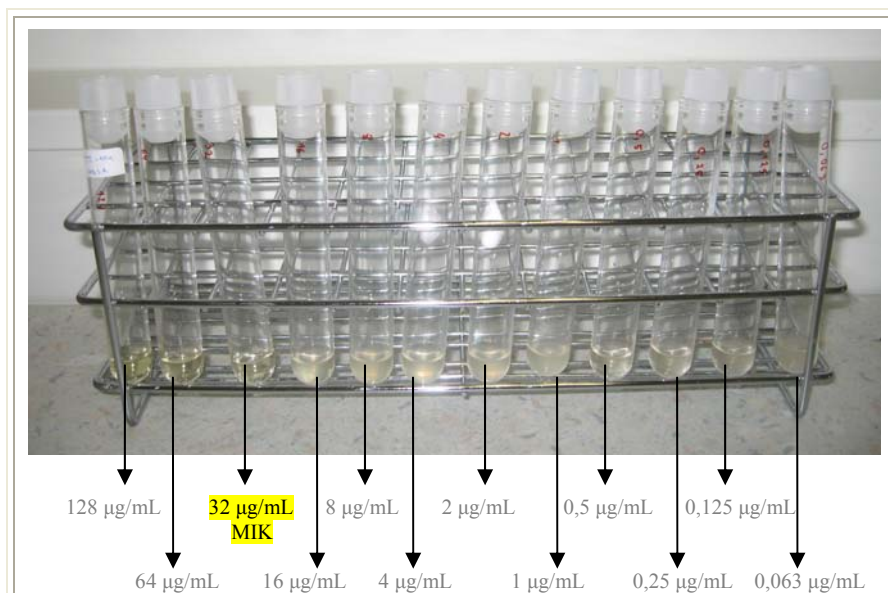
Drugič (3. test) bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL in 2 µg/mL, pri koncentraciji 1 µg/mL pa motnost gojišča ni bila dobro vidna. Po precepitvi razredčin s koncentracijami od 128 µg/mL do 0,5 µg/mL smo MIK tokrat ovrednotili kot 2 µg/mL. Ponovili smo tudi dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 0,5 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato da smo MBK ponovno ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Ker smo pri 2. in 3. testu določili različen MIK, smo testiranje ponovili še tretjič (4. test) Bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL in 2 µg/mL, zato smo MIK tokrat spet ovrednotili kot 2 µg/mL.

Ponovili smo tudi dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 1 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato da smo MBK ponovno ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Izkazalo se je, da smo spojini TT-114 v treh testiranjih določili dva različna MIK-a: enkrat 0,5 µg/mL (2. test) in dvakrat 2 µg/mL (3. test, 4. test). Do tega bi lahko prišlo, ker so bile razredčine spojine v času med izvajanjem posameznih testov zamrznjene in bi spojina medtem lahko izgubljala učinkovitost. Možno pa je tudi, da je med izvajanjem antibiograma prišlo do kakšne napake. Ker ne moremo zagotovo vedeti, zakaj je prišlo do teh odstopanj, smo končni MIK na sevu *S. aureus* ATCC 29213 ovrednotili kot vrednost med 0,5 µg/mL in 2 µg/mL.

Zaradi dobrega učinka spojine TT-114 na sev *S. aureus* ATCC 29213 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB vrednotili še njeno učinkovitost v vseh štirinajstih koncentracijah na dodatnem sevu MRSA. Po inkubaciji bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 128 µg/mL, 64 µg/mL in 32 µg/mL, zato smo MIK ovrednotili kot 32 µg/mL (Slika 21).



**Slika 21:** Razredčine spojine TT-114 z vidnim MIK-om 32 µg/mL na sevu MRSA.

Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu MRSA. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 16 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po

inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Kontrola metode:

### **Metoda dilucijskega antibiograma v agarju**

Ker je spojina TT-114 pokazala dober učinek na sev *S. aureus* ATCC 29213, učinek pa je imela tudi na sev MRSA, smo z metodo dilucijskega antibiograma v agarju vrednotili njeno učinkovitost še na dveh dodatnih G<sup>+</sup> sevih, *S. pneumoniae* ATCC 49619 in *S. pyogenes* ATCC 19615 v dvojniku (1. test, 2. test). Pri sevu *S. pyogenes* ATCC 19615 smo na mestu nanosa inokuluma pri vseh štirih koncentracijah zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK obakrat ovrednotili kot večji od 128 µg/mL. Pri sevu *S. pneumoniae* ATCC 49619 na mestu nanosa inokuluma nismo zaznali bakterijske rasti pri koncentracijah 128 µg/mL in 64 µg/mL, zato smo MBK obakrat ovrednotili kot 64 µg/mL.

Kontrola metode

- ❖ Kontrola ustreznosti metode s pozitivno in negativno kontrolo:
- ❖ Precepljanje bakterijskega inokuluma na nove plošče KA:
- ❖ Inkubacija bakterijskega inokuluma:
- ❖ Opazovanje inkubiranih inokuliranih plošč trdnega agar-dilucijskega gojišča z vgrajeno spojino TT-114: Test na *S. pneumoniae* ATCC 49619:   
Test na *S. pyogenes* ATCC 19615:

Ob primerjavi bakterijskih kolonij s kolonijami iz primarnih delovnih kultur smo zaznali neskladje, saj okoli kolonij nismo opazili pasu beta hemolize (prozornega pasu zaradi popolne lize eritrocitov). Ker smo sklepali, da zrastle kolonije niso kolonije seva *S. pyogenes* ATCC 19615 in da je prišlo do kontaminacije s kakšnim drugim sevom, smo zrastle kolonije iz vseh štirih trdnih agar-dilucijskih gojišč s koncentracijami spojine TT-114 od 128 µg/mL do 16 µg/mL precepili na nove plošče KA. Po inkubaciji smo jih spet primerjali s kolonijami iz primarnih delovnih kultur in tokrat ugotovili, da se ujemajo. Tako smo dokazali, da so bile zrastle kolonije res kolonije seva *S. pyogenes* ATCC 19615.

Učinkovitost spojine TT-114

Tudi spojina TT-114 je strukturno podobna spojini TT-98, ki deluje kot nekompetitivni inhibitor ligaz Mur, je pa lipofilnejša, saj so vse tri hidroksilne skupine na fenilnem obroču

zamenjane s fluoro skupinami, kar naj bi izboljšalo njeno prehajanje preko bakterijske citoplazemske membrane. Testiranja na bakterijskih sevih so pokazala izboljšano učinkovitost v primerjavi s spojinama TT-98 in tudi LKV-16. Spojina TT-114 je bila učinkovita na *S. aureus* (MIK je od 0,5 µg/mL do 2 µg/mL, to za spojino TT-114 pomeni od 1,8 µM do 7,3 µM, kar so koncentracije, podobne MIK-om klinično uporabnih protimikrobnih učinkovin) in tudi na odporni sev MRSA (MIK je 32 µg/mL), spekter delovanja pa se je razširil na še eno G<sup>+</sup> bakterijski vrsto, *S. pneumoniae* (MBK je 64 µg/mL). Ker pa pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur ni pokazala inhibitorne aktivnosti, lahko sklepamo, da spojina TT-114 podobno kot spojina LKV-16 ne učinkuje kot inhibitor ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem.

Pred kratkim so bila opravljena protibakterijska testiranja strukturno podobne spojine, derivata benziliden-4-tiookso-tiazolidin-2-ona, ki ima na fenilnem obroču tri kloro skupine. Podobno kot spojina TT-114 je pokazala dobro protimikrobno učinkovitost na *S. aureus* (MIK je 4 µg/mL), pa tudi na *E. faecalis* in *Bacillus subtilis* (MIK je 2 µg/mL) (55). To nakazuje, da uvedba treh halogenskih skupin na fenilni obroč pomembno vpliva na protimikrobno učinkovitost spojine.

#### 4.3.5 Spojina LKV-04

**Preglednica XI:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine LKV-04.

Standardni sev	Koncentracija spojine LKV-04 [µg/mL]														MIK [µg/mL]	MBK [µg/mL]			
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016					
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	+	+	+													128		
Precepitev na KA	25	✓																	>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	+	+	+													128		
Precepitev na KA	15	✓																	>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+													>128		
Precepitev na KA	✓																		>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-+	+	+	+													>128		
Precepitev na KA	✓	✓																	>128
MRSA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128		
Precepitev na KA	3	✓																	>128



## Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini LKV-04 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB najprej vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih. Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevu *E. coli* ATCC 25922 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na sevu *E. coli* ATCC 25922 ovrednotili kot večja od 128 µg/mL. Pri sevu *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri koncentraciji 128 µg/mL motnost gojišča ni bila dobro vidna. Po precepitvi razredčin s koncentracijama 128 µg/mL in 64 µg/mL smo tudi na sevu *P. aeruginosa* ATCC 27853 MIK in MBK ovrednotili kot večja od 128 µg/mL.

Pri sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *E. faecalis* ATCC 29212 pri koncentraciji 128 µg/mL bakterijske rasti nismo zaznali, zato smo MIK na teh dveh sevih ovrednotili kot 128 µg/mL. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *E. faecalis* ATCC 29212. Razredčini s koncentracijama 128 µg/mL in 64 µg/mL smo precepili na novi plošči KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK na obeh sevih ovrednotili kot večja od 128 µg/mL.

Zaradi učinka spojine LKV-04 na sev *S. aureus* ATCC 29213 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB vrednotili še njeno učinkovitost v vseh štirinajstih koncentracijah na dodatnem sevu MRSA. Po inkubaciji bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentraciji 128 µg/mL, zato smo MIK ovrednotili kot 128 µg/mL. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu MRSA. Razredčini s koncentracijama 128 µg/mL in 64 µg/mL smo precepili na novi plošči KA in po inkubaciji na obeh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Kontrola metode:

### Učinkovitost spojine LKV-04

Spojina LKV-04 ima NH-skupino rodanina (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona) substituirano s karboksimetilensko skupino. Testiranjih na izoliranih ligazah Mur so pokazala dobro inhibitorno aktivnost spojine (RA MurD pri koncentraciji 100 µM je 54%, IC<sub>50</sub> na MurE je 19 µM, IC<sub>50</sub> na MurF je 6 µM), testiranja na bakterijskih sevih pa niso v celoti potrdila učinkovitosti spojine. Spojina je sicer pokazala učinek na vseh testiranih G<sup>+</sup> bakterijskih sevih (*S. aureus*, odporni sev MRSA, *E. faecalis*), vendar v zelo visokih koncentracijah (MIK je 128 µg/mL). Ker je spojina zaradi treh hidroksilnih skupin na fenilnem obroču

precej hidrofilna, smo sklepali, da ne more prehajati preko bakterijske citoplazemske membrane in smo testiranje zato izvedli še na dveh lipofilnejših derivatih (spojini LKV-02 in LKV-05).

#### **4.3.6 Spojini LKV-02 in LKV-05**

Spojini LKV-02 in LKV-05 sta strukturno podobni spojini LKV-04, sta pa lipofilnejši, saj imata na fenilnem obroču namesto treh hidroksilnih skupin tri metoksi skupine (spojina LKV-02) oziroma tri fluoro skupine (spojina LKV-05), kar naj bi izboljšalo njuno prehajanje preko bakterijske citoplazemske membrane. Vendar pa spojini nista pokazali ne inhibitorne aktivnosti na izoliranih ligazah Mur, ne protimikrobne učinkovitosti na bakterijskih sevih.

#### **4.3.7 Učinkovitost derivatov benziliden rodanina (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona)**

V skladu z učinkovitostjo doslej znanih benziliden rodaninskih derivatov (derivatov benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona) so tudi pri naših testiranjih derivati benziliden rodanina pokazali najboljšo protimikrobno učinkovitost med vsemi testiranimi strukturnimi skupinami (10).

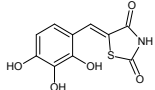
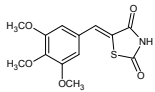
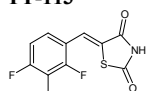
Po učinkovitosti zelo izstopata spojini LKV-16 in TT-114, ki sta na *S. aureus* dosegli MIK v klinično pomembnih koncentracijah (MIK LKV-16 je 8 µg/mL, kar pomeni 25,7 µM in MIK TT-114 je od 0,5 do 2 µg/mL, kar pomeni od 1,8 µM do 7,3 µM), kar daje odlično iztočnico za nadaljne raziskave, pokazali pa sta tudi učinek na odporni sev MRSA (MIK LKV-16 je 128 µg/mL ali nižji, MIK TT-114 je 32 µg/mL) in TT-114 na sev *S. pneumoniae* (MIK je 64 µg/mL). Vendar pa glede na strukturno podobnost spojin LKV-16 in TT-114 in glede na to, da pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur nista pokazali inhibitorne aktivnosti, lahko sklepamo, da spojini ne učinkujeta kot inhibitorja ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem.

Zanimivi bi bili tudi nadaljni testi na spojini TT-98, ki je edina od benziliden rodaninskih derivatov (derivatov benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona) pokazala učinek na G<sup>-</sup> bakterijo *P. aeruginosa*, in to celo baktericiden (MBK je 128 µg/mL).

V strukturni skupini benziliden rodaninov (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-onov) s prosto NH-skupino rodanina lahko opazimo, da večanje lipofilnosti vpliva na izboljšanje protimikrobne učinkovitosti, saj se je učinkovitost spojine večala z zamenjavo hidroksilnih skupin na fenilnem obroču z metoksi skupinami in nadalje s fluoro skupinami.

## 4.4 DERIVATI BENZILIDEN-1,3-TIAZOLIDIN-2,4-DIONA

**Preglednica XII:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti derivatov benziliden-1,3-tiazolidin-2,4-diona.

	MIK in MBK [µg/mL]	STANDARDNI SEV				
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	MRSA
1 <b>TT-107</b> 	MIK	128	>128	>128	>128	
	MBK	>128	>128	>128	>128	
2 <b>LKV-14</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128	
	MBK	>128	>128	>128	>128	
3 <b>TT-113</b> 	MIK	32	>128	>128	>128	64
	MBK	>128	>128	>128	>128	>128

### 4.4.1 Spojina TT-107

**Preglednica XIII:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine TT-107.

Standardni sev	Koncentracija spojine TT-107 [µg/mL]				MIK [µg/mL]	MBK [µg/mL]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	+	+	+	128	
Precepitev na KA	✓	✓	✓			>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓	✓				>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓	✓				>128

### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini TT-107 smo vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih. Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevu *E. coli* ATCC 25922 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na sevu *E. coli*

ATCC 25922 ovrednotili kot večja od 128 µg/mL. Pri sevih *E. faecalis* ATCC 29212 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri koncentraciji 128 µg/mL motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je pri sevu *E. faecalis* ATCC 29212 do tega najbrž prišlo zato, ker so kolonije *E. faecalis* v suspenziji zelo majhne. Po precepitvi razredčin s koncentracijama 128 µg/mL in 64 µg/mL smo tudi na sevih *E. faecalis* ATCC 29212 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 MIK in MBK ovrednotili kot večja od 128 µg/mL.

Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 pri koncentraciji 128 µg/mL bakterijske rasti nismo zaznali, pri koncentraciji 64 µg/mL pa motnost gojišča ni bila dobro vidna. Po precepitvi razredčin s koncentracijami od 128 µg/mL do 32 µg/mL smo MIK ovrednotili kot 128 µg/mL. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 32 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Kontrola metode:

#### Učinkovitost spojine TT-107

Spojina TT-107 je pri testiranjih na izoliranih encimih pokazala odlično inhibitorno aktivnost na vse štiri ligaze Mur (pri koncentraciji 100 µM je RA MurC 15% in RA MurD 16,5%, IC<sub>50</sub> na MurE je 2,7 µM, IC<sub>50</sub> na MurF je 4 µM), testiranje na bakterijskih sevih pa njene učinkovitosti ni v celoti potrdilo. Spojina je učinek je pokazala le na *S. aureus*, pa še to v zelo visoki koncentraciji (MIK je 128 µg/mL). Ker je spojina zaradi treh hidroksilnih skupin na fenilnem obroču precej hidrofilna, smo sklepali, da ne more prehajati preko bakterijske citoplazemske membrane in smo testiranje zato izvedli še na dveh lipofilnejših derivatih (spojini LKV-14 in TT-113).

#### **4.4.2 Spojina LKV-14**

Spojina LKV-14 je strukturno podobna spojini TT-107, je pa lipofilnejša, saj ima na fenilnem obroču namesto treh hidroksilnih tri metoksi skupine, kar naj bi izboljšalo njeno prehajanje preko bakterijske citoplazemske membrane. Vendar pa spojina ni pokazala ne inhibitorne aktivnosti na izoliranih ligazah Mur, ne protimikrobne učinkovitosti na bakterijskih sevih. Zanimivo pa je, da je strukturni analog spojine LKV-14, spojina LKV-16, ki ima namesto 1,3-tiazolidin-2,4-dionskega rodaninski obroč (2-tiookso-1,3-tiazolidin-

4-on), pokazala zelo dobro protimikrobno učinkovitost, kar nakazuje, da je za protimikrobni učinek pomembna tiokso skupina.

### 4.4.3 Spojina TT-113

Preglednica XIV: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine TT-113.

	Standardni sev	Koncentracija spojine TT-113 [ $\mu\text{g/mL}$ ]													MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]				
		128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031			0,016			
1. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	+													32		
	Precepitev na KA	10	20	✓	✓															>128
2. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	+													32		
	Precepitev na KA	200	200	200	✓															>128
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+															>128
	Precepitev na KA	✓																		>128
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+															>128
	Precepitev na KA	✓																		>128
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+															>128
	Precepitev na KA	✓																		>128
	MRSA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64		
	Precepitev na KA	60	✓	✓																>128

#### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini TT-113 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB najprej vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih. Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevih *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh sevih ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 pri 1. testu pri koncentracijah 128  $\mu\text{g/mL}$ , 64  $\mu\text{g/mL}$  in 32  $\mu\text{g/mL}$  bakterijske rasti nismo zaznali, zato smo MIK ovrednotili kot 32  $\mu\text{g/mL}$ . Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Vse razredčine smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128  $\mu\text{g/mL}$ . Ker smo na sevu *S. aureus* ATCC 29213 testirali le štiri najvišje koncentracije spojine TT-113, določili pa smo MIK 32  $\mu\text{g/mL}$ , smo za potrditev rezultata testiranje ponovili (2. test) in dobili enake rezultate.

Zaradi učinka spojine TT-113 na sev *S. aureus* ATCC 29213 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB vrednotili še njeno učinkovitost v vseh štirinajstih

koncentracijah na dodatnem sevu MRSA. Po inkubaciji bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 128 µg/mL in 64 µg/mL, zato smo MIK ovrednotili kot 64 µg/mL. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu MRSA. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 32 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Kontrola metode:

#### Učinkovitost spojine TT-113

Tudi spojina TT-113 je strukturno podobna spojini TT-107, je pa lipofilnejša, saj so vse tri hidroksilne skupine na fenilnem obroču zamenjane s fluoro skupinami, kar naj bi izboljšalo njeno prehajanje preko bakterijske citoplazemske membrane. Spojina na izoliranih ligazah Mur ni pokazala inhibitorne aktivnosti, nasprotno kot v primeru spojine LKV-114 pa je v visokih koncentracijah pokazala protimikrobno učinkovitost na *S. aureus* (MIK je 32 µg/mL) in tudi na odporni sev MRSA (MIK je 64 µg/mL), iz česar lahko sklepamo, da spojina TT-113 ne učinkuje kot inhibitor ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem. Zanimivo pa je, da je strukturni analog spojine TT-113, spojina TT-114, ki ima namesto 1,3-tiazolidin-2,4-dionskega rodaninski obroč (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-on), pokazala precej boljšo protimikrobno učinkovitost, kar podobno kot v primeru spojin LKV-14 in LKV-16 nakazuje, da je za protimikrobni učinek pomembna tiookso skupina.

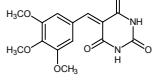
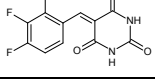
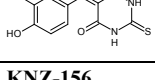
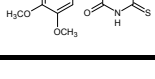
#### **4.4.4 Učinkovitost derivatov benziliden-1,3-tiazolidin-2,4-diona**

Med vsemi testiranimi derivati benziliden-1,3-tiazolidin-2,4-diona je bila najučinkovitejša spojina TT-113, ki je na sevu *S. aureus* dosegla MIK 32 µg/mL, na odpornem sevu MRSA pa MIK 64 µg/mL, kar pa so previsoke koncentracije za potencialno klinično uporabnost. Vendar pa glede na to, da pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur ni pokazala inhibitorne aktivnosti, lahko sklepamo, da spojina ne učinkuje kot inhibitor ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem.

V strukturni skupini benziliden-1,3-tiazolidin-2,4-dionov lahko opazimo učinek zamenjave tiookso skupine pri derivatih benziliden rodanina (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona) z okso skupino, saj imajo derivati s tiookso skupino boljšo protimikrobno učinkovitost.

## 4.5 DERIVATI BENZILIDEN BARBITURNE KISLINE (benziliden-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pirimidin-triona) IN BENZILIDEN TIOBARBITURNE KISLINE (benziliden-2- tiookso-4,6(1*H*,5*H*)-pirimidin-diona)

**Preglednica XV:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti derivatov benziliden barbiturne kisline (benziliden-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pirimidin-triona) in benziliden tiobarbiturne kisline (benziliden-2-tiookso-4,6(1*H*,5*H*)-pirimidin-diona).

	MIK in MBK [µg/mL]	STANDARDNI SEV				MRSA
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
1 <b>KNZ-152</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128	
	MBK	>128	>128	>128	>128	
2 <b>KNZ-153b</b> 	MIK	32-64	>128	>128	>128	128
	MBK	>128	>128	>128	>128	>128
3 <b>KNZ-158b</b> 	MIK	64	>128	>128	128	128
	MBK	>128	>128	>128	>128	>128
4 <b>KNZ-156</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128	
	MBK	>128	>128	>128	>128	

### 4.5.1 Spojina KNZ-152

Spojina KNZ-152 na izoliranih ligazah Mur ni bila testirana, testiranja na bakterijskih sevih pa so pokazala, da nima protibakterijske učinkovitosti. Zanimivo pa je, da je njen strukturni analog, spojina LKV-16, ki ima v strukturi namesto barbiturne kisline (2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pirimidin-triona) rodaninski obroč (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-on), pokazala zelo dobro protimikrobno učinkovitost. To nakazuje, da je za protibakterijsko učinkovitost pomemben rodaninski obroč.

## 4.5.2 Spojina KNZ-153b

Preglednica XVI: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine KNZ-153b.

	Standardni sev	Koncentracija spojine KNZ-153b [ $\mu\text{g/mL}$ ]													MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]				
		128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031			0,016			
1. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	+														32	
	Precepitev na KA	30	50	50	✓															>128
2. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	+	+														64	
	Precepitev na KA	25	40	✓	✓															>128
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	+	+	+														>128	
	Precepitev na KA	✓	✓																	>128
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+														>128	
	Precepitev na KA	✓																		>128
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+														>128	
	Precepitev na KA	✓																		>128
	MRSA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		128	
	Precepitev na KA	✓	✓																	>128

### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini KNZ-153b smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB najprej vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih. Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevih *E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh dveh sevih ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ . Pri sevu *E. faecalis* ATCC 29212 pri koncentraciji 128  $\mu\text{g/mL}$  motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je do tega najbrž prišlo zato, ker so kolonije *E. faecalis* v suspenziji zelo majhne. Po precepitvi razredčin s koncentracijama 128  $\mu\text{g/mL}$  in 64  $\mu\text{g/mL}$  smo tudi na sevu *E. faecalis* ATCC 29212 MIK in MBK ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 pri 1. testu pri koncentracijah 128  $\mu\text{g/mL}$ , 64  $\mu\text{g/mL}$  in 32  $\mu\text{g/mL}$  bakterijske rasti nismo zaznali, zato smo MIK ovrednotili kot 32  $\mu\text{g/mL}$ . Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Vse razredčine smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Ker smo na sevu *S. aureus* ATCC 29213 testirali le štiri najvišje koncentracije spojine KNZ-153b, določili pa smo MIK 32  $\mu\text{g/mL}$ , smo za potrditev rezultata testiranje ponovili (2. test). Bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 128  $\mu\text{g/mL}$  in 64  $\mu\text{g/mL}$ , zato



smo tokrat MIK ovrednotili kot 64 µg/ml, končni MIK pa kot vrednost med 32 µg/ml in 64 µg/ml. Ponovili smo tudi dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Vse razredčine smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ponovno ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Zaradi učinka spojine KNZ-153b na sev *S. aureus* ATCC 29213 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB vrednotili še njeno učinkovitost v vseh štirinajstih koncentracijah na dodatnem sevu MRSA. Po inkubaciji bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentraciji 128 µg/mL, zato smo MIK ovrednotili kot 128 µg/mL. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu MRSA. Razredčini s koncentracijama 128 µg/mL in 64 µg/mL smo precepili na novi plošči KA in po inkubaciji na obeh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Kontrola metode:

#### Učinkovitost spojine

Spojina KNZ-153b je strukturno podobna spojini KNZ-152. Testiranja na bakterijskih sevih so pokazala, da v nasprotju s spojino KNZ-152 v visokih koncentracijah učinkuje na *S. aureus* (MIK je od 32 do 64 µg/mL) in tudi na odporni sev MRSA (MIK je 128 µg/mL), ker pa na izoliranih ligazah Mur ni bila testirana, obstaja možnost, da spojina KNZ-153b ne učinkuje kot inhibitor ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem. Zanimivo pa je, da je njen strukturni analog, spojina TT-114, ki ima v strukturi namesto barbiturne kisline (2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pirimidin-triona) rodaninski obroč (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-on), pokazala boljšo protimikrobno učinkovitost. To podobno kot v primeru spojin KNZ-152 in LKV-16 nakazuje, da je za protibakterijsko učinkovitost pomemben rodaninski obroč.

### 4.5.3 Spojina KNZ-158b

Preglednica XVII: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine KNZ-158b.

Standardni sev	Koncentracija spojine KNZ-158b [ $\mu\text{g/mL}$ ]													MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]			
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031			0,016		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	+	+													64	
Precepitev na KA	$\frac{10}{10}$	✓	✓															>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	+	+	+														>128
Precepitev na KA	✓	✓																>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+														>128
Precepitev na KA	✓																	>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	+	+														128
Precepitev na KA	✓	✓																>128
MRSA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		128
Precepitev na KA	✓	✓																>128

#### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini KNZ-158b smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB najprej vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih. Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevu *E. coli* ATCC 25922 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na sevu *E. coli* ATCC 25922 ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ . Pri sevu *E. faecalis* ATCC 29212 pri koncentraciji 128  $\mu\text{g/mL}$  motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je do tega najbrž prišlo zato, ker so kolonije *E. faecalis* v suspenziji zelo majhne. Po precepitvi razredčin s koncentracijama 128  $\mu\text{g/mL}$  in 64  $\mu\text{g/mL}$  smo tudi na sevu *E. faecalis* ATCC 29212 MIK in MBK ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 pri koncentracijah 128  $\mu\text{g/mL}$  in 64  $\mu\text{g/mL}$  bakterijske rasti nismo zaznali, zato smo MIK ovrednotili kot 128  $\mu\text{g/mL}$ . Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Razredčine s koncentracijami od 128  $\mu\text{g/mL}$  do 32  $\mu\text{g/mL}$ , smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Pri sevu *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri koncentraciji 128  $\mu\text{g/mL}$  bakterijske rasti nismo zaznali, zato smo MIK ovrednotili kot 128  $\mu\text{g/mL}$ . Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *P. aeruginosa* ATCC 27853. Razredčini s koncentracijama 128

$\mu\text{g/mL}$  in  $64 \mu\text{g/mL}$  smo precepili na novi plošči KA in po inkubaciji na obeh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od  $128 \mu\text{g/mL}$ .

Zaradi učinka spojine KNZ-158b na sev *S. aureus* ATCC 29213 smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB vrednotili še njeno učinkovitost v vseh štirinajstih koncentracijah na dodatnem sevu MRSA. Po inkubaciji bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentraciji  $128 \mu\text{g/mL}$ , zato smo MIK ovrednotili kot  $128 \mu\text{g/mL}$ . Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu MRSA. Razredčini s koncentracijama  $128 \mu\text{g/mL}$  in  $64 \mu\text{g/mL}$  smo precepili na novi plošči KA in po inkubaciji na obeh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od  $128 \mu\text{g/mL}$ .

Kontrola metode:

#### Učinkovitost spojine KNZ-158b

Testiranja na bakterijskih sevih so pokazala, da spojina KNZ-158b učinkuje na *S. aureus* (MIK je  $64 \mu\text{g/mL}$ ), tudi na odporni sev MRSA (MIK je  $128 \mu\text{g/mL}$ ) in na *P. aeruginosa* (MIK je  $128 \mu\text{g/mL}$ ). Te koncentracije so sicer previsoke za potencialno klinično uporabnost, vendar pa je bila spojina KNZ-158b ena izmed dveh testiranih (poleg spojine DVR-74), ki je pokazala učinek tako na  $G^+$  (*S. aureus*, MRSA), kot na  $G^-$  (*P. aeruginosa*) bakterije. Ker pa pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur ni pokazala inhibitorne aktivnosti, lahko sklepamo, da spojina KNZ-158b ne učinkuje kot inhibitor ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem. Zanimivo pa je, da je strukturni analog spojine, spojina TT-98, ki ima v strukturi namesto tiobarbiturne kisline (2-tiookso-4,6(1*H*,5*H*)-pirimidin-diona) rodaninski obroč (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-on), pokazala odlično inhibitorno aktivnost na ligaze Mur in tudi šibko protimikrobno učinkovitost. To nakazuje, da je za protibakterijsko učinkovitost pomemben rodaninski obroč.

#### **4.5.4 Spojina KNZ-156**

Spojina KNZ-156 je strukturno podobna spojini KNZ-158b. Na izoliranih ligazah Mur ni bila testirana, testiranja na bakterijskih sevih pa so pokazala, da nima protimikrobne učinkovitosti. Zanimivo pa je, da tudi njen strukturni analog, spojina KNZ-152, ki ima v strukturi namesto tiobarbiturne kisline (2-tiookso-4,6(1*H*,5*H*)-pirimidin-diona) barbiturno kislino (2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pirimidin-trion), ni pokazala protimikrobnega učinka, medtem ko je strukturni analog z rodaninskim obročem (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-onom), spojina

LKV-16, pokazala zelo dobro protimikrobno učinkovitost. To podobno kot v primeru spojin KNZ-152 in LKV-16 ter spojin KNZ-158b in TT-98 nakazuje, da je za protibakterijsko učinkovitost pomemben rodaninski obroč.

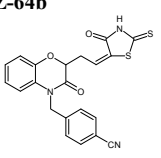
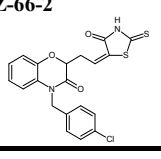
#### **4.5.5 Učinkovitost derivatov benziliden barbiturne kisline (benziliden-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidin-triona) in benziliden tiobarbiturne kisline (benziliden-2-tiookso-4,6(1H,5H)-pirimidin-diona)**

Med vsemi testiranimi derivati benziliden barbiturne kisline (benziliden-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidin-triona) in benziliden tiobarbiturne kisline (benziliden-2-tiookso-4,6(1H,5H)-pirimidin-diona) je bila najučinkovitejša spojina KNZ-158b, vendar ne toliko v smislu učinkovitosti v dovolj nizkih koncentracijah (MIK na *S. aureus* je 64 µg/mL, MIK na MRSA in *P. aeruginosa* je 128 µg/mL), pač pa v smislu spektra delovanja, saj je poleg spojine DVR-74 edina pokazala protimikrobno učinkovitost tako na G<sup>+</sup> kot tudi na G<sup>-</sup> bakterijske seve. Vendar pa glede na to, da pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur ni pokazala inhibitorne aktivnosti, lahko sklepamo, da spojina ne učinkuje kot inhibitor ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem.

V strukturni skupini benziliden barbiturnih kislin (benziliden-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidin-trionov) oziroma benziliden tiobarbiturnih kislin (benziliden-2-tiookso-4,6(1H,5H)-pirimidin-dionov) lahko opazimo učinek zamenjave rodaninskega obroča (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona) z barbiturno oziroma tiobarbiturno kislino, saj imajo derivati z rodaninskim obročem boljšo protimikrobno učinkovitost.

## 4.6 DERIVATI 2H-1,4-BENZOKSAZIN-3(4H)-ONA

**Preglednica XVIII:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti derivatov 2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-ona.

	MIK in MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	STANDARDNI SEV			
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1 KNZ-64b 	MIK	32	32	>128	>128
	MBK	>128	>128	>128	>128
2 KNZ-66-2 	MIK	32	>128	>128	>128
	MBK	>128	>128	>128	>128

### 4.6.1 Spojina KNZ-64b

**Preglednica XIX:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine KNZ-64b.

	Standardni sev	Koncentracija spojine KNZ-64b [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
		128	64	32	16		
1. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-+	-	-	+	32	>128
	Precepitev na KA	100	✓	✓	✓		
2. test	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-+	-	-	+	32	>128
	Precepitev na KA	100	✓	✓	✓		
1. test	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	-	-	+	32	>128
	Precepitev na KA	100	100	✓	✓		
2. test	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	-	-	+	32	>128
	Precepitev na KA	100	100	✓	✓		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	>128
	Precepitev na KA	✓					
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	>128
	Precepitev na KA	✓					

#### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini KNZ-64b smo vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih. Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevih *E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh dveh sevih ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Pri 1. testu na sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *E. faecalis* ATCC 29212 pri koncentraciji 128  $\mu\text{g/mL}$  motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je možno, da je do tega prišlo

zaradi obarvanosti spojine, ki je bila izrazitejša pri najvišji koncentraciji, pri koncentracijah 64 µg/mL in 32 µg/mL pa bakterijske rasti nismo zaznali. Takšni rezultati so bili sicer nekoliko nejasni, vseeno pa smo po precepitvi vseh štirih razredčin MIK na sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *E. faecalis* ATCC 29212 ovrednotili kot 32 µg/mL. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *E. faecalis* ATCC 29212. Vse razredčine smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK na obeh sevih ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Zaradi nejasnih rezultatov smo testiranje na sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *E. faecalis* ATCC 29212 ponovili (2. test), vendar smo dobili enake rezultate.

Kontrola metode:

#### Učinkovitost spojine KNZ-64b

Pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur je spojina KNZ-64b pokazala inhibitorno aktivnost (pri koncentraciji 100 µM je RA MurD 36,8% in RA MurE 79,6%), vendar je bila "dose-response" krivulja zelo strma, Hillov koeficient pa je bil 2,4, kar nakazuje na promiskuitetno oziroma nespecifično inhibicijo (56, 57). Testiranja spojine na bakterijskih sevih so pokazala učinkovitost na G<sup>+</sup> bakterijska seva *S. aureus* in *E. faecalis* (MIK na obeh sevih je 32 µg/mL).

### 4.6.2 Spojina KNZ-66-2

**Preglednica XX:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine KNZ-66-2.

Standardni sev	Koncentracija spojine KNZ-66-2 [µg/mL]														MIK [µg/mL]	MBK [µg/mL]
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	
Precepitev na KA	3	18	✓	✓	✓	✓										>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	+	+	+											>128	
Precepitev na KA	✓	✓														>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+											>128	
Precepitev na KA	✓															>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+											>128	
Precepitev na KA	✓															>128

## Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini KNZ-66-2 smo vrednotili učinkovitost na treh standardnih bakterijskih sevih (*E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853) v štirih najvišjih koncentracijah in na enem (*S. aureus* ATCC 29213) v vseh štirinajstih. Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevih *E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh dveh sevih ovrednotili kot večja od 128 µg/mL. Pri sevu *E. faecalis* ATCC 29212 pri koncentraciji 128 µg/mL motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je do tega najbrž prišlo zato, ker so kolonije *E. faecalis* v suspenziji zelo majhne. Po precepitvi razredčin s koncentracijama 128 µg/mL in 64 µg/mL smo tudi na sevu *E. faecalis* ATCC 29212 MIK in MBK ovrednotili kot večja od 128 µg/mL.

Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 pri koncentracijah 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL in 8 µg/mL bakterijske rasti nismo zaznali, pri vmesni (16 µg/mL) in nižjih (od 4 µg/mL do 0,016 µg/mL) pa. Po precepitvi razredčin s koncentracijami od 128 µg/mL do 4 µg/mL smo MIK ovrednotili kot 32 µg/mL, zaradi nekoliko nejasnih rezultatov pa je možno, da je dejanski MIK nižji ali da je prišlo med izvedbo antibiograma do kakšne napake, naprimer pri redčenju osnovne raztopine spojine z MHB. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevu *S. aureus* ATCC 29213. Razredčine s koncentracijami od 128 µg/mL do 4 µg/mL smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot večji od 128 µg/mL.

Kontrola metode:

### Učinkovitost spojine KNZ-66-2

Pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur je spojina KNZ-66-2 pokazala inhibitorno aktivnost (pri koncentraciji 100 µM je RA MurD 35,9% in RA MurE 12,4%), vendar je bila "dose-response" krivulja zelo strma, Hillov koeficient pa je bil 2,9, kar podobno kot pri spojini KNZ-64b nakazuje na promiskuitetno oziroma nespecifično inhibicijo (56, 57). Testiranja spojine na bakterijskih sevih so pokazala učinkovitost na *S. aureus* (MIK je 32 µg/mL), v nasprotju s spojino KNZ-64b pa spojina KNZ-66-2 ni bila učinkovita na *E. faecalis*. Iz tega sklepamo, da zamenjava kloro skupine na fenilnem obroču pri spojini KNZ-66-2 s ciano skupino pri spojini KNZ-64b razširi spekter delovanja.

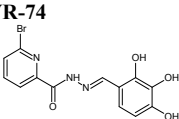
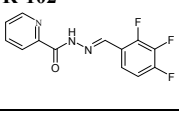
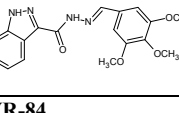
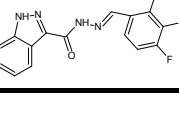
### 4.6.3 Učinkovitost derivatov 2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-ona

Oba testirana derivata 2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-ona sta pokazala protimikrobni učinek z MIK vrednostmi 32 µg/mL na G<sup>+</sup> bakterijske seve (*S. aureus*, spojina KNZ-64b tudi na *E. faecalis*). Vendar pa je bila pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur bila pri obeh spojinah "dose-response" krivulja zelo strma, Hillov koeficient pa je bil večji od 1. To lahko nakazuje na promiskuitetno oziroma nespecifično inhibicijo, do katere pogosto pride pri manjših molekulah predvsem pri višjih koncentracijah zaradi vezave v več vezavnih mest na encimu, zaradi tvorbe agregatov ali pa, če koncentracija encima občutno prekorači K<sub>d</sub> vrednost inhibitorja (56, 57).

Rezultati testiranj derivatov 2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-ona so nakazali tudi možnost spreminjanja spektra delovanja spojine s spreminjanjem substituentov na fenilnem obroču, saj se je z zamenjavo kloro skupine s ciano skupino spekter delovanja iz *S. aureus* razširili še na *E. faecalis*.

## 4.7 DERIVATI ACIL-HIDRAZONOV

**Preglednica XXI:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti derivatov acil-hidrazonov.

		MIK in MBK [µg/mL]	STANDARDNI SEV			
			<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	<b>DVR-74</b> 	MIK	64	>128	>128	64
		MBK	>128	>128	>128	>128
2	<b>DVR-102</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
		MBK	>128	>128	>128	>128
3	<b>DVR-91</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
		MBK	>128	>128	>128	>128
4	<b>DVR-84</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
		MBK	>128	>128	>128	>128



## 4.7.1 Spojina DVR-74

Preglednica XXII: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine DVR-74.

Standardni sev	Koncentracija spojine DVR-74 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-+	-	+	+	64	
Precepitvev na KA	✓	✓	✓			>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitvev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitvev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-+	-	+	+	64	
Precepitvev na KA	✓	✓	✓			>128

### Metoda makrodilucijskega antibiograma v MH bujonu

Spojini DVR-74 smo vrednotili učinkovitost v štirih najvišjih koncentracijah na štirih standardnih bakterijskih sevih. Po inkubaciji smo bakterijsko rast zaznali pri sevih *E. faecalis* ATCC 29212 in *E. coli* ATCC 25922 pri vseh štirih razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh dveh sevih ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Pri sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri koncentraciji 128  $\mu\text{g/mL}$  motnost gojišča ni bila dobro vidna, vendar je možno, da je do tega prišlo zaradi obarvanosti spojine, ki je bila izrazitejša pri najvišji koncentraciji, pri koncentraciji 64  $\mu\text{g/mL}$  pa bakterijske rasti nismo zaznali. Takšni rezultati so bili sicer nekoliko nejasni, vseeno pa smo po precepitvi razredčin s koncentracijami od 128  $\mu\text{g/mL}$  do 32  $\mu\text{g/mL}$  MIK na sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 ovrednotili kot 64  $\mu\text{g/mL}$ . Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK na sevih *S. aureus* ATCC 29213 in *P. aeruginosa* ATCC 27853. Razredčine s koncentracijami od 128  $\mu\text{g/mL}$  do 32  $\mu\text{g/mL}$  smo precepili na nove plošče KA in po inkubaciji na vseh zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK na obeh sevih ovrednotili kot večja od 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Kontrola metode:

### Učinkovitost spojine DVR-74

Spojina DVR-74 je pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur pokazala dobro inhibitorno aktivnost (pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  je RA MurE 14% in RA MurF 21%). Testiranje na bakterijskih sevih njene učinkovitosti ni v celoti potrdilo, saj je spojina pokazala učinek na *S. aureus* in *P. aeruginosa* le v visokih koncentracijah (MIK na obeh sevih je 64  $\mu\text{g/mL}$ ).

Kljub temu pa je spojina DVR-74 ena izmed dveh testiranih (poleg spojine KNZ-158b), ki je pokazala učinek tako na  $G^+$  (*S. aureus*) kot na  $G^-$  (*P. aeruginosa*) bakterije. Ker je spojina zaradi treh hidroksilnih skupin na fenilnem obroču precej hidrofilna, smo sklepali, da ne more prehajati preko bakterijske citoplazemske membrane in smo testiranje zato izvedli še na treh lipofilnejših derivatih (spojine DVR-102, DVR-91 in DVR-84).

#### **4.7.2 Spojine DVR-102, DVR-91 in DVR-84**

Spojine DVR-102, DVR-91 in DVR-84 so strukturno podobne spojini DVR-74, so pa lipofilnejše, saj imajo na fenilnem obroču namesto treh hidroksilnih tri metoksi skupine (spojina DVR-91) oziroma tri fluoro skupine (spojini DVR-102 in DVR-84), kar naj bi izboljšalo njihovo prehajanje preko bakterijske citoplazemske membrane. Spojina DVR-84 je pokazala dobro inhibitorno aktivnost na izoliranih ligazah Mur (pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  je RA MurE 67% in RA MurF 27%), spojini DVR-102 in DVR-91 pa ne. Nobena izmed spojin ni pokazala protimikrobne učinkovitosti na bakterijskih sevih. Zanimivo pa je, da sta njihova strukturna analoga, spojin LKV-16 in TT-114, ki imata v strukturi namesto acil-hidrazonske skupine rodaninski obroč (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-on), pokazali zelo dobro protimikrobno učinkovitost. To nakazuje, da je za protibakterijsko učinkovitost pomemben rodaninski obroč.

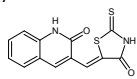
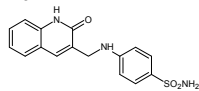
#### **4.7.3 Učinkovitost derivatov acil-hidrazonov**

Med vsemi testiranimi derivati acil-hidrazonov je bila najučinkovitejša spojina DVR-74, vendar ne toliko v smislu učinkovitosti v dovolj nizkih koncentracijah (MIK na *S. aureus* in *P. aeruginosa* je 64  $\mu\text{g/mL}$ ), pač pa v smislu spektra delovanja, saj je poleg spojine KNZ-158b edina pokazala protimikrobno učinkovitost tako na  $G^+$  kot tudi na  $G^-$  bakterijske seve.

V strukturni skupini acil-hidrazonov lahko opazimo učinek zamenjave rodaninskega obroča (2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona) z acil-hidrazonsko skupino, saj imajo derivati z acil-hidrazonsko skupino slabšo protimikrobno učinkovitost.

## 4.8 DERIVATI 2(1*H*)-KINOLINONA

Preglednica XXIII: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti derivatov 2(1*H*)-kinolinona.

	MIK in MBK [μg/mL]	STANDARDNI SEV				
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
1	<b>TT-77</b> 	Testiranja nismo izvedli.				
2	<b>TT-64</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
	MBK	>128	>128	>128	>128	

### 4.8.1 Spojina TT-77

Spojina TT-77 na izoliranih ligazah Mur ni bila testirana, njene protimikrobne učinkovitosti pa nismo mogli ovrednotiti, saj se je spojina ob dodatku MHB takoj oborila v obliki kosmičev, ki se niso več dali redispergirati, zato izvedba antibiograma z našo izbrano metodo ni bila možna.

### 4.8.2 Spojina TT-64

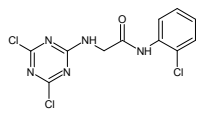
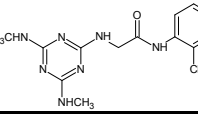
Spojina TT-64 ni pokazala ne inhibitorne aktivnosti na izoliranih ligazah Mur, ne protimikrobne učinkovitosti na bakterijskih sevih.

### 4.8.3 Učinkovitost derivatov 2(1*H*)-kinolinona

O učinkovitosti derivatov 2(1*H*)-kinolinona ne moremo z gotovostjo trditi ničesar, saj smo testirali le eno spojino iz te strukturne skupine, pa še ta ni pokazala protibakterijske učinkovitosti.

## 4.9 DERIVATI TRIAZINA

Preglednica XXIV: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti derivatov triazina.

		MIK in MBK [µg/mL]	STANDARDNI SEV			
			<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	<b>LKV-36</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
		MBK	>128	>128	>128	>128
2	<b>LKV-42</b> 	MIK	>128	>128	>128	>128
		MBK	>128	>128	>128	>128

### 4.9.1 Spojini LKV-36 in LKV-42

Spojina LKV-42 na izoliranih ligazah Mur ni pokazala inhibitorne aktivnosti, spojina LKV-36 pa ni bila testirana. Nobena od njiju ni pokazala protimikrobne učinkovitosti na bakterijskih sevih.

### 4.9.2 Učinkovitost derivatov triazina

Nobeden izmed testiranih derivatov triazina ni pokazal protimikrobne učinkovitosti.

## 5 SKLEP

Šestindvajsetim od sedemindvajsetih spojin (spojini TT-77 z izbrano metodo učinkovitosti nismo mogli ovrednotiti), načrtovanih kot inhibitorji ligaz Mur, smo z metodama makrodilucijskega antibiograma v Muller Hinton bujonu in dilucijskega antibiograma v agarju uspešno ovrednotili učinkovitost v obliki vrednosti MIK in MBK na dveh standardnih  $G^+$  (*S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212) in dveh standardnih  $G^-$  (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) bakterijskih sevih. Najučinkovitejšim šestim spojinam smo ovrednotili tudi učinkovitost na odpornem sevu *S. aureus* ATCC 43300 (sev MRSA), dvema pa še na dveh dodatnih  $G^+$  sevih *S. pneumoniae* ATCC 49619 in *S. pyogenes* ATCC 19615.

Protimikrobno učinkovitost je pokazalo enajst spojin. Večina jih je učinkovala na  $G^+$  bakterijske seve, predvsem na *S. aureus* (deset spojin) in odporni sev MRSA (vseh šest testiranih spojin), le dve pa na *E. faecalis* (LKV-04, KNZ-64b) in ena z baktericidnim učinkom na *S. pneumoniae* (TT-114). Večina je kazala bakteriostatično učinkovitost v previsokih koncentracijah za potencialno klinično uporabnost, derivata benziliden rodanina (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona) LKV-16 in TT-114 pa sta dosegla MIK v koncentraciji 8  $\mu\text{g/mL}$  (za spojino LKV-16 to pomeni 25,7  $\mu\text{M}$ ) oziroma od 0,5 do 2  $\mu\text{g/mL}$  (za spojino TT-114 to pomeni od 1,8  $\mu\text{M}$  do 7,3  $\mu\text{M}$ ) in bi bila primerna za nadaljne raziskave. Ker pa nobena od teh dveh spojin pri testiranjih na izoliranih ligazah Mur ni pokazala inhibitorne aktivnosti, lahko sklepamo, da spojini ne učinkujeta kot inhibitorja ligaz Mur, pač pa je za zaviranje bakterijske rasti odgovoren drug mehanizem, ki ga nismo raziskali.

Samo tri spojine (TT-98, KNZ-158b, DVR-74) so pokazale protimikrobno učinkovitost na  $G^-$  bakterijski sev *P. aeruginosa*, ena od njih baktericidno (TT-98), vendar v previsokih koncentracijah za potencialno klinično uporabnost, na  $G^-$  bakterijski sev *E. coli* pa sploh nobena, kar je verjetno posledica visoke intrinzične odpornosti teh dveh sevov (33, 34, 30).

Najširši spekter delovanja na  $G^+$  bakterijske seve sta pokazali spojini TT-114 s protibakterijsko učinkovitostjo na *S. aureus*, odporni sev MRSA in *S. pneumoniae* ter LKV-04 z učinkom na *S. aureus*, odporni sev MRSA in *E. faecalis*. Edini spojini, ki sta izkazali protimikrobno učinkovitost tako na  $G^+$  kot na  $G^-$  bakterijske seve, sta bili spojini

KNZ-158b z učinkom na *S. aureus*, odporni sev MRSA in *P. aeruginosa* ter spojina DVR-74 z učinkom na *S. aureus* in *P. aeruginosa*.

Kot strukturna skupina so bili najučinkovitejši derivati benziliden rodanina (benziliden-2-tiookso-1,3-tiazolidin-4-ona), saj so protibakterijsko učinkovitost pokazale kar štiri od sedmih testiranih spojin (TT-98, LKV-16, TT-114, LKV-04). Učinkoviti so bili tudi posamezni derivati benziliden-1,3-tiazolidin-2,4-diona (TT-107, TT-113), benziliden barbiturne in tiobarbiturne kisline oziroma benziliden-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-pirimidin-triona in benziliden-2-tiookso-4,6(1*H*,5*H*)-pirimidin-diona (KNZ-153b, KNZ-158b) ter 2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-ona (KNZ-64b, KNZ-66-2), manj derivati acil-hidrazonov (DVR-74), medtem ko derivati D-glutaminske kisline, 2(1*H*)-kinolinona in triazina niso pokazali nobene protimikrobne učinkovitosti.

Protibakterijsko testiranje nam je pokazalo, da dobra inhibitorna aktivnost spojine na izoliranih ligazah Mur še ne zagotavlja tudi dobre protimikrobne učinkovitosti, saj je glavni problem neučinkovitosti potencialnih inhibitorjev ligaz Mur neuspešno prehajanje preko bakterijske citoplazemske membrane.

Rezultati protibakterijskih testiranj so izpostavili dve obetavni spojini s protimikrobno učinkovitostjo (LKV-16, TT-114), ki pa najbrž ne učinkujeta kot inhibitorja ligaz Mur, hkrati pa nam nakazujejo smer nadaljnega razvoja novih potencialnih inhibitorjev ligaz Mur in prispevajo k razumevanju odnosa med strukturo in delovanjem protibakterijskih učinkovin.

## 6 LITERATURA

1. Bush K, Macielag M, Weidner-Wells M: Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond Phase 1. *Current Opinion in Microbiology*, **2004**; 7 (5): 466-476.
2. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP: *Biology of Microorganisms*, 12<sup>th</sup> Ed, Pearson Education, San Francisco, 2009; a: strani 1-24, b: strani 66-106, c: strani 909-911.
3. Black JG: *Microbiology: Principles and Explorations*, 5<sup>th</sup> Ed, John Wiley & Sons, ZDA, 2002; a: strani 4-27, b: strani 72-89, c: strani 343-347, d: 377-379.
4. Levinson W, Jawetz E: *Medical Microbiology & Immunology: Examination & Board Review*, 7<sup>th</sup> Ed, McGraw-Hill Companies, ZDA, 2002; a: strani 4-13, b: strani 59-79, c: strani 91-106, d: strani 115-132, e: strani 437-452.
5. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Farmaceutski vestnik*, **1999**; 50 (2): 183-193.
6. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: *Pharmacology*, 5<sup>th</sup> Ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003: 620-653.
7. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **2002**; 6 (1): 1-20.
8. Vaara M: Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **1992**; 56 (3): 395-411.
9. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycane structure and architecture. *Microbiology Reviews*, **2008**; 32 (2): 149-167.
10. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, **2008**; 32 (2): 168-207.
11. El Zoeiby A, Sanschagrín F, Levesque RC: Structure and function of Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology*, **2003**; 47 (1): 1-12.
12. Smith CA: Structure, Function and Dynamics in the *mur* Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *Journal of Molecular Biology*, **2006**; 362 (4): 640-655.
13. Kotnik M, Humljan J, Contreras-Martel C, Oblak M, Kristan K, Hervé M, Blanot D, Urleb U, Gobec S, Dessen A, Solmajer T: Structural and Functional Characterization of Enantiomeric Glutamic Acid Derivates as Potential Transition State Analogue Inhibitors of MurD Ligase. *Journal of Molecular Biology*, **2007**; 370 (1): 107-115.
14. Mol CD, Brooun A, Dougan DR, Hilgers MT, Tari LW, Wijnands RA, Knuth MW, McRee DE, Swanson RV: Crystal Structures of Active Fully Assembled Substrate- and

- Product-Bound Complexes of UDP-*N*-Acetylmuramic Acid: L-Alanine Ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*, **2003**; *185* (14): 4152-4162.
15. Bertrand JA, Fanchon E, Martin L, Chantalat L, Auger G, Blanot D, van Heijenoort J, Dideberg O: "Open" structures of MurD: domain movements and structural similarities with folylpolyglutamate synthetase. *Journal of Molecular Biology*, **2000**; *301* (5): 1257-1266.
16. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blanot D, Le Beller D, van Heijenoort J, Dideberg O: Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes. *Journal of Molecular Biology*, **1999**; *289* (3): 579-590.
17. Cooper BS, Stone SP, Kibbler CC, Cookson BD, Roberts JA, Medley GF, Duckworth GJ, Lai R, Ebrahim S: Systematic review of isolation policies in the hospital management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A review of the literature with epidemiological and economical modeling. *International Journal of Technology Assessment in Health Care*, **2005**; *21* (1): 144-150.
18. Rubinovitch B, Pittet D: Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the endemic hospital: what have we learned? *Journal of Hospital Infection*, **2001**; *47* (1): 9-18.
19. Haddadin AS, Fappiano SA, Lipsett PA: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgraduate Medical Journal*, **2002**; *78*: 385-392.
20. Maltezou HC, Giamarellou H: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2006**; *27* (2): 87-96.
21. Seme K, Mueller-Premru M: Spremljanje občutljivosti izolatov *Streptococcus pyogenes* in *Streptococcus pneumoniae*, osamljenih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani od leta 1994 do 2002, *Medicinski Razgledi*, **2003**; *42* (Suppl 1): 11-21.
22. Izdebski R, Sadowy E, Fielt J, Grzesiowski P, Gniadkowski M, Hryniewicz: Clonal Diversity and Resistance Mechanisms in Tetracycline-Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**; *51* (4): 1155-1163.
23. Forbes BA, Sohm DF, Weissfeld AS: Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 11<sup>th</sup> Ed, St. Louis, Mosby, 2000: 884-898.



24. La Plante KL, Rybak MJ, Tsuji B, Lodise TP, Kaatz GW: Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Area Under the Concentration-Time Curve/MIC Ratio and Resistance Development with Gatifloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin and Moxifloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**; *51* (4): 1315-1320.
25. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA: Medicinal microbiology, 4<sup>th</sup> Ed, St. Louis, Mosby, 2002: 217-235.
26. Štrumbelj I, Ribič H, Franko-Kancler T, Božanič V, Košnik IG, Sarjanovič L, Kavčič M, Harlander T: *Streptococcus pyogenes* in *Streptococcus pneumoniae* – odpornost izolatov iz dihal v prvem tričetrletju leta 2001 in 2002. *Medicinski razgledi*, **2003**; *42* (Suppl 1): 3-10.
27. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002; 427-446.
28. Kaufman CA: Therapeutic and preventive options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2003**; *51* (Suppl. S3): iii23-iii30.
29. Paterson DL, Bonomo RA: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, **2005**; *18* (4): 657-686.
30. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE: Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-inducer efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **1995**; *16* (1): 45-55.
31. Bradford PA: Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, **2001**; *14* (4): 933-951.
32. Livermore DM: Minimising antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, **2005**; *5* (7): 450-459.
33. Normark BH, Normark S: Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med*, **2002**; *252* (2): 91-108.
34. Hogan D, Kolter R: Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology*, **2002**; *5* (5): 472-477.
35. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 6<sup>th</sup> Ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2008: 1028-1046.
36. Hardman JG, Limbird LE: Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics 10<sup>th</sup> Ed, McGraw-Hill Companies, 2001: 1189-1193.

37. Scholar EM, Pratt WB: *The Antimicrobial Drugs*, 2<sup>nd</sup> Ed, Oxford University Press, New York, 2000: 37-48.
38. Martinez JL, Baquero F: Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2000**; *44* (7): 1771-1777.
39. Sefton AM: Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Their Clinical Relevance in the New Millennium. *Drugs*, **2002**; *62* (4): 557-566.
40. Tenover FC: Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clinical Infectious Diseases*, **2001**; *33* (Suppl 3): S108-S115.
41. Silver LL: Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, **2006**; *71* (7): 996-1005.
42. Reck F, Marmor S, Fisher S, Wuonola MA: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurC. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2001**; *11* (11): 1451-1454.
43. Gegnas LD, Wadell ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1998**; *8*: 1643-1648.
44. Li Z, Francisco GD, Hu W, Labthavikul P, Petersen PJ, Severin A, Singh G, Yang Y, Rasmussen BA, Lin YI, Skotnicki JS, Mansour TS: 2-Phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno[3,2-c]pyrazol-3-ol derivatives as new inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2003**; *13* (15): 2591-2594.
45. MM Sim, SB Ng, Buss AD, Crasta SC, KL Goh, SK Lee: Benzylidene Rhodanines as Novel Inhibitors of UDP-N-Acetylmuramate/L-Alanine Ligase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2002**; *12* (14): 697-699.
46. Antane S, Caufield CE, Hu W, Keeney D, Labthavikul P, Morris K, Naughton SM, Petersen PJ, Rasmussen BA, Singh G, Yang Y: Pulvinones as bacterial cell wall biosynthesis inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2006**; *16* (1): 176-180.
47. Gubina M, Mueller-Premru M: Piročnik za vaje iz mikrobiologije in imunologije, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2005: 99-106.
48. Murrey PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH: *Manual of Clinical Microbiology*, American Society of Microbiology, Washington, 1999: 1327-1341.
49. Davidson PM, Sofos JN, Branen AL: *Antimicrobials in food*. New York, CRC Press, 2005: 659-680.

50. Turk S: Iskanje inhibitorjev Mur ligaz z virtualnim rešanjem bank spojin, diplomska naloga, 2007.
51. [www.atcc.org](http://www.atcc.org)
52. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1994: Fifth informational supplement M100S5.
53. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 3<sup>rd</sup> Ed, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1993: Approved standard M7-A3 in M7-A7.
54. Standardni operativni postopki, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, 2007: SOP-R GOJ-24, SOP-R GOJ-36, SOP-R GOJ-37, SOP-R GOJ-113, SOP-R GOJ-115.
55. Gouveia FL, de Oliveira RMB, de Oliveira TB, da Silva IM, do Nascimento SC, de Sena KXFR, de Albuquerque JFC: Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*; **2008**: 1-6.
56. Shoichet BK: Interpreting Steep Dose-Response Curves in Early Inhibitor Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**; 49 (25): 7274-7277.
57. Seidler J, McGovern SL, Doman TN, Shoichet BK: Identification and Prediction of Promiscuous Aggregating Inhibitors among Known Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**; 46: 4477-4486.

## 7 PRILOGA

Preglednica XXV: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine TT-96.

Standardni sev	Koncentracija spojine TT-96 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	-+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓	✓	✓			>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

Preglednica XXVI: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine TT-89.

Standardni sev	Koncentracija spojine TT-89 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓	✓				>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

Preglednica XXVII: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine DVR-40.

Standardni sev	Koncentracija spojine DVR-40 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓	✓				>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

Preglednica XXVIII: Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine TT-111.

Standardni sev	Koncentracija spojine TT-111 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXIX:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine LKV-02.

Standardni sev	Koncentracija spojine LKV-02 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXX:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine LKV-05.

Standardni sev	Koncentracija spojine LKV-05 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓	✓				>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXI:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine LKV-14.

Standardni sev	Koncentracija spojine LKV-14 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXII:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine KNZ-152.

Standardni sev	Koncentracija spojine KNZ-152 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓	✓				>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXIII:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine KNZ-156.

Standardni sev	Koncentracija spojine KNZ-156 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXIV:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine DVR-102.

Standardni sev	Koncentracija spojine DVR-102 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXV:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine DVR-91.

Standardni sev	Koncentracija spojine DVR-91 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXVI:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine DVR-84.

Standardni sev	Koncentracija spojine DVR-84 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXVII:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine TT-64.

Standardni sev	Koncentracija spojine TT-64 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXVIII:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine LKV-36.

Standardni sev	Koncentracija spojine LKV-36 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128

**Preglednica XXXIX:** Rezultati testiranja protibakterijske učinkovitosti spojine LKV-42.

Standardni sev	Koncentracija spojine LKV-42 [ $\mu\text{g/mL}$ ]				MIK [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MBK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
	128	64	32	16		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	>128	
Precepitev na KA	✓					>128