

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**



Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*

**TADEJ TOMAŠIČ**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM  
INDUSTRIJSKA FARMACIJA**

**Ljubljana, januar 2014**

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**



Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*

**TADEJ TOMAŠIČ**

**DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA  
CIANOTIOFENSKIH ZAVIRALCEV LIGAZE MurF**

**DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF  
CYANTHIOPHENE MURF LIGASE INHIBITORS**

**Mentor: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.**

**Ljubljana, januar 2014**

Magistrsko delo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm., sem opravljal na oddelku za mikrobiologijo Biotehniške fakultete, v somentorstvu asist. dr. Polonce Štefanič ter na Zavodu za zdravstveno varstvo Novo mesto v mikrobiološkem laboratoriju.

## **Zahvala**

Zahvalil bi se rad izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm. za strokovno usmerjanje in napotke tekom praktičnega in kasneje še bolj, teoretičnega dela magistrske naloge in dr. Polonci Štefanič za ogromno pomoč v laboratoriju. Hvala obema za vse nasvete, razlage ter vložen čas in trud. Marku ter njegovi ekipi hvala za testirane spojine. Hvala ZZV-ju Novo mesto, še posebej predstojnici mikrobiološkega oddelka Tatjani Harlander, dr. med., spec. klin. mikrobiologije, za omogočeno delo v prostorih zavoda in uporabo opreme ter zaposlenim na oddelku mikrobiologije za sodelovanje pri pripravi kultur, opreme in pripomočkov. Hvala Matjaž, Petra, Mateja, Ljubica ter ostali. Hvala Jasmina za ljubezen in spodbujanje pri izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se mami za kuhana kosila ter očetu za toplo ogrevano sobo v zimskih dneh ☺.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm ter somentorstvom asist. dr. Polonce Štefanič.

Tadej Tomašič

**Predsednik komisije:** prof. dr. Stanko Srčič

**Mentor:** izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

**Somentorica:** asist. dr. Polonca Štefanič

**Član komisije:** doc. dr. Damjan Janeš

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>II</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO TABEL.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO SHEME.....</b>	<b>IV</b>
<b>POVZETEK .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA</b>	<b>1</b>
<b>1.2. PRIPRAVA MIKROTIRSKIH PLOŠČ S TEKOČIM GOJIŠČEM</b>	<b>2</b>
1.2.1. Resazurin	3
1.2.2. Gojišče krvni agar (KA)	3
1.2.3. Tekoči bujon	3
1.2.4. Inokulacijska raztopina ali inokulum	4
<b>1.3. SPLOŠNO O ANTIBIOTIKIH IN BAKTERIJSKI ODPORNOSTI</b>	<b>4</b>
<b>1.4. BAKTERIJSKA CELICA</b>	<b>6</b>
<b>1.4.1. Celična stena bakterij</b>	<b>6</b>
1.4.1.1. Po gramu pozitivne (G+) in po gramu negativne (G-) bakterije .....	6
1.4.1.2. Peptidoglikan in njegova sinteza.....	8
<b>1.5. MURAMIL LIGAZE (LIGAZE Mur) IN MurF TER NJENA STRUKTURA</b>	<b>11</b>
<b>1.5.1. Inhibitorji MurF</b>	<b>12</b>
1.5.1.1. 2. generacija inhibitorjev MurF zasnovanih na cianotiofenski strukturi .....	13
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>15</b>
<b>4. EKSPERIMENTALNO DELO .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. PRIPRAVA KULTURE (MO)</b>	<b>20</b>

<b>4.2.</b>	<b>PRIPRAVA GOJIŠČA</b>	<b>20</b>
<b>4.3.</b>	<b>PRIPRAVA RESAZURINA</b>	<b>20</b>
<b>4.4.</b>	<b>PRIPRAVA INOKULACIJSKE SUSPENZIJE</b>	<b>21</b>
<b>4.5.</b>	<b>ISKANJE GOSTOTE CELIC <i>S. pneumoniae</i> IN <i>S. aureus</i> PRIMERNE ZA MIC</b>	<b>22</b>
<b>4.6.</b>	<b>PRIPRAVA INOKULACIJSKE RAZTOPINE (INOKULUM)</b>	<b>23</b>
<b>4.7.</b>	<b>PRIPRAVA MIKRODILUCIJSKE PLOŠČE</b>	<b>25</b>
<b>4.7.1.</b>	<b>Postopek priprave ploščice:</b>	<b>25</b>
<b>4.7.2.</b>	<b>Pozitivna kontrola</b>	<b>27</b>
<b>4.7.3.</b>	<b>Kontrola vpliva topila na zaviranje rasti MO</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.</b>	<b>REZULTATI MIC</b>	<b>29</b>
<b>5.2.</b>	<b>KOMENTAR</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>33</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>35</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> primeri MIC testov.....	2
<b>Slika 2:</b> reakcijska shema, ki ponazarja redukcijo Resazurina.....	3
<b>Slika 3:</b> razlike v zgradbi bakterijske in sesalske celice.....	4
<b>Slika 4:</b> razlike v zgradbi celične stene G+ in G- bakterij .....	7
<b>Slika 5:</b> shematski prikaz peptidoglikana in povezave med posameznimi enotami. ....	8
<b>Slika 6:</b> sinteza peptidoglikana v posameznih stopnjah .....	10
<b>Slika 7:</b> kristalna struktura aktivirane MurF ligaze <i>S. pneumoniae</i> v kompleksu.....	11
<b>Slika 8:</b> sulfonamidna inhibitorja MurF ter triazinski derivat.....	12
<b>Slika 9:</b> skupina tiazolilaminopirimidinskih inhibitorjev MurF.....	12
<b>Slika 10:</b> 4-fenilpiperidin - prvi antibiotik z delovanjem na MurF in diarilkinolon ....	13
<b>Slika 11:</b> spojina (IX) in (X) – razvoj cianotiofenskega skeleta 2. gen. inhibitorjev ....	13
<b>Slika 12:</b> osnovna strukturna formula cianotiofenskih inhibitorjev 2. gen., tip I.....	17
<b>Slika 13:</b> osnovna strukturna formula cianotiofenskih inhibitorjev 2. gen., tip II .....	19
<b>Slika 14:</b> neuspela 24-urna inkubacija <i>S. pneumoniae</i> .....	22
<b>Slika 15:</b> <i>S. pneumoniae</i> , po prekonočni inkubaciji na krvnem agarju. ....	22
<b>Slika 16:</b> poizkus nacepljene plošče z različnimi konc. MO.....	23
<b>Slika 17:</b> primer; MIC plošča po 24h, modificirana z resazurinskim indikatorjem. ....	27
<b>Slika 18:</b> primer; vpliv DMSO pri zaviranju rasti bakterije ( <i>E. coli</i> ).....	28
<b>Slika 19:</b> cianotiofenski inhibitorji – predvidena vezava v aktivno mesto encima....	31

## KAZALO TABEL

<b>Tabela I:</b> cianotiofenski inhibitorji 2. gen. uporabljeni pri MIC testih, tip I.....	17
<b>Tabela II:</b> cianotiofenski inhibitorji 2. gen. uporabljeni pri MIC testih, tip II I.....	19
<b>Tabela III:</b> tabela raztapljanja učinkovin.....	24
<b>Tabela IV:</b> tabela MIC vrednosti za antimikrobna sredstva na izbrane seve MO.....	28
<b>Tabela V:</b> rezultati MIC vrednosti testiranih spojin na seve bakterij. ....	29

## KAZALO SCHEM

<b>Shema 1:</b> shema pripravljene ploščice za testiranje spojin z MIC metodo.....	25
--	----

## SEZNAM OKRAJŠAV IN TUJK

<b>Ab</b>	antibiotik
<b>AcCoA</b>	acetilkoencim A
<b>ATP</b>	adenozintrifosfat
<b>C<sub>55</sub>-P</b>	baktoprenol oz. undekaprenilfosfat
<b>D-Ala</b>	D-alanin
<b>Ddl</b>	D-alanil:D-alanin ligaza
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetilglukozamin
<b>GlmM</b>	fosfoglukozamin mutaza
<b>GlmS</b>	glukozamin 6-fosfat sintaza
<b>GlmU</b>	bifunkcionalen encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in glukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
<b>Inokulum</b>	mešanica inokulacijske suspenzije, indikatorja in gojišče
<b>Lipid I</b>	undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapeptid
<b>Lipid II</b>	undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc
<b>m-Dpm</b>	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
<b>McF</b>	McFarland standard
<b>MHB 2 (CA)</b>	s Ca <sup>2+</sup> in Mg <sup>2+</sup> kationi obogateno agarško gojišče - Muller Hinton Broth 2 Cation Adjusted
<b>MIC</b>	minimalna inhibitorna koncentracija
<b>MO</b>	mikroorganizem
<b>Mpl</b>	muropeptidna ligaza
<b>MRSA</b>	na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MurA</b>	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
<b>MurB</b>	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
<b>MurC</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat L-alanin ligaza
<b>MurD</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat ligaza
<b>MurE</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-meso-diaminopimelat ligaza
<b>MurF</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-meso-diaminopimelat-D-alanin-D-alanin ligaza

<b>MurG</b>	<i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
<b>MurNAc</b>	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
<b>NCCLS/CLSI</b>	Inštitut za klinično in laboratorijsko standardizacijo
<b>OD</b>	optična gostota (angl optical density)
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>SAR</b>	odnos med strukturo in učinkom
<b>PBP</b>	proteini, ki vežejo peniciline (ang. Penicillin-binding proteins«)
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>VRSA</b>	na vankomicin odporen <i>S. aureus</i>



## POVZETEK

MurF ligaza spada v skupino od ATP odvisnih aminokislinskih muramil ligaz (MurC, MurD, MurE, MurF) in katalizira zadnji korak pri sintezi UDP-MurNAc-pentapeptida, prekursorja nastanka peptidoglikana. Z učinkovitim zaviranjem reakcije lahko zaviramo nastanek pentapeptida in posledično povzročimo lizo bakterijske celice. Ta encim je eden ključnih za nastajanje celične stene in tako primerna tarča za razvoj novih selektivnih protibakterijskih učinkovin - zaviralcev MurF ligaz.

V okviru magistrske naloge smo se osredotočili na ugotavljanje protibakterijskega delovanja 26 sintetiziranih spojin. Spojinam smo merili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC vrednost), to je minimalna koncentracija učinkovine, ki zavira rast bakterij. Testirane spojine so optimizirani cianotiofenski zaviralci 2. generacije, z dokazanim zaviralnim delovanjem na ligazo MurF. Pridobili smo jih na FFA (Fakulteti za farmacijo, UNI Lj) ter jih testirali na naslednjih sevih: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* in *Staphylococcus aureus*.

Za indikacijo rasti ter bolj natančno določitev MIC smo uporabili indikator resazurin, kot v člankih z že podobno izvedenimi testi [5]. Za določanje MIC spojinam na sevih *E. coli* ter *P. aeruginosa* nismo imeli težav pri izvedbi testov. Pri določenih spojinah smo imeli nekaj težav pri raztapljanju, zaradi njihove velike lipofilnosti. Pri *S. pneumoniae* in *S. aureus* so se pojavljale težave pri rasti kulture. Potrebno je bilo prilagoditi oz. povečati začetno gostoto celic, s čimer smo uspešno nadaljevali teste.

Večini testiranim spojinam smo izmerili MIC vrednosti in prikazali, da nekaj njih izkazuje razmeroma močno protimikrobno delovanje. Spojina 13 ima najmočnejše protibakterijsko delovanje in ima na cianotiofensko ogrodje pripeto gvanidinski substituent, ki predvidoma zaradi tvorbe dodatnih ionskih in vodikovih vezi pomembno vpliva na afiniteto vezave spojine v aktivno mesto encima in s tem posledično tudi na močnejše protimikrobno delovanje.

V splošnem je dilucijska metoda za določanje MIC enostavna za odčitavanje, občutljiva, hitra, robustna ter zanesljiva in jo lahko uspešno uporabimo za rutinsko ugotavljanje protimikrobnega delovanja spojin.

## ABSTRACT

MurF ligase belongs to the group of ATP-dependent aminoacid, muramyl ligases (MurC, MurD, MurE, MurF) and catalyses one of the the final steps in synthesis of UDP-MurNAc-pentapeptide, the precursor of peptidoglycane formation. The effective interfering of MurF activity may lead to inhibition of pentapeptide formation and consequently to lysis of bacterial cells. This protein is essential for the formation of cell wall and thus suitable target for the development of new selective antibacterial agents - MurF ligase inhibitors.

In the context of the master's thesis we focused on the determination of antibacterial activity of 26 synthesized compounds. The goal was to determine MIC - the minimum concentration of the substance which inhibits bacterial growth. The compounds used are optimized cyanothiophene 2nd generation MurF inhibitors. The compounds were designed and synthesized on the FFA (Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana) and we have tested them on the following strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* in *Staphylococcus aureus*.

For the indication of growth and more accurate determination of the MIC, resazurin was used as an indicator. For the MIC determination on strains *E. coli* and *P. aeruginosa* we did not have any problems with the tests execution. In the case of certain compounds, we had a few problems with dissolution, due to their substantial lipophilicity. In the case of *S. pneumoniae* and *S. aureus* problems occurred with the growth of the culture. It was necessary to adjust the initial density of the cells to effectively perform the tests.

The MIC values were determined on majority of bacterial strains for each compound and some of them exhibit pronounced anti-microbial activity. Compound 13 has the most potent antibacterial activity. The later includes a guanidine substituent attached to the cyanothiophene scaffold, which is expected to form additional ionic and hydrogen bonds. The later contribute significantly to the binding affinity of the compounds in the active site of the enzyme and consequently also have impact on the stronger anti-microbial activity.

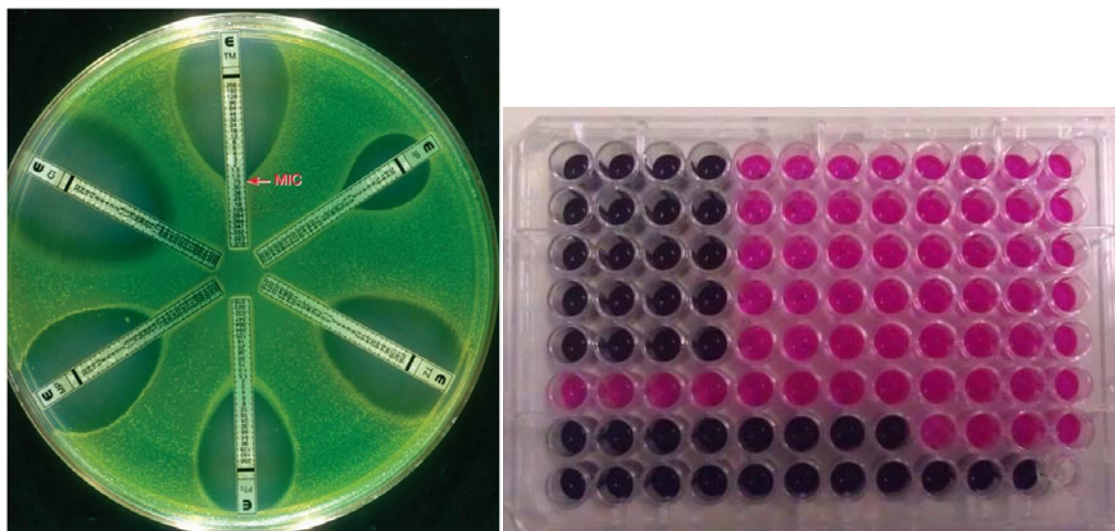
In general, the MIC method is easy to read, sensitive, rapid, robust and reliable and can be successfully used to determine the antimicrobial activity of the compound routinely.

# 1. UVOD

## 1.1. MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) protimikrobne spojine je najnižja koncentracija te spojine, ki inhibira rast in razmnoževanje preiskovanega mikroorganizma (MO) [1]. Ugotavljanje MIC je pomembno v diagnostičnih laboratorijih za potrjevanje na zdravila odpornih MO ter pri ugotavljanju protimikrobne učinkovitosti nove učinkovine [2]. Gre za eno najosnovnejših laboratorijskih meritev za ugotavljanje učinkovitosti ter izbire določenega protimikrobnega zdravila proti specifičnemu mikrobu. Pri izvajanju MIC testa lahko uporabimo tako trdna agarska, kot tekoča gojišča, npr. Muller Hinton Broth (MHB). V osnovi ločimo dilucijske (dilucijski test v vialah, na mikrotitrskih ploščicah) ter difuzijske teste (disk difuzijska Kirby-Bauer-jeva metoda, E-testi). Dilucijski testi z uporabo tekočih gojišč so najširše uporabljeni v kliničnih laboratorijih [1]. Difuzijske teste pa največkrat uporabljamo kot kvalitativno metodo za ugotavljanje ali je nek MO odporen na protimikrobno sredstvo ali ne [3]. Koncentracijo določimo v laboratoriju z inkubiranjem določene koncentracije mikroorganizma z znanimi redčinami protimikrobne spojine. Nato pogledamo katera koncentracija je najnižja, ki inhibira rast MO. Ob upoštevanju CLSI (do 1. 2005 NCCLS) predstavitvenih kriterijev rezultat oz. stopnjo občutljivosti izrazimo kot [1]:

- S = občutljiv (*sensitive*) – z običajnim odmerkom antibiotika dosežemo inhibitorno koncentracijo zdravila v krvi.
- I = zmerno občutljiv (*intermediate*) – močno povišan odmerek zdravila bo morda učinkovit, sicer je potrebno določiti MIC.
- R = neobčutljiv ali odporen (*resistant*) – dosežena koncentracija v krvi ne zavira bakterije.



**Slika 1:** Primeri MIC testov; levo – E-test trakovi; na traku je impregnirana naraščujoča koncentracija antibiotika, kjer se na trdnem gojišču opazuje zaviranje rasti MO (povzeto po [4]); desno - test na mikrodilucijskih ploščah v tekočem agarskem gojišču, kjer se vidi zaviranje rasti bakterij v vrsticah s pomočjo indikatorja (povzeto iz praktičnega dela magistrske naloge).

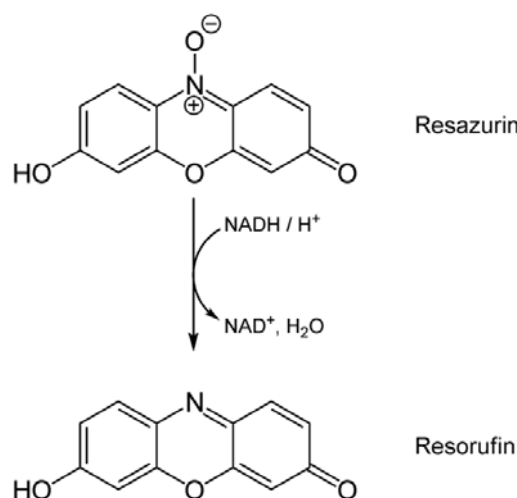
## 1.2. PRIPRAVA MIKROTIRSKIH PLOŠČ S TEKOČIM GOJIŠČEM

Pri magistrski nalogi smo za iskanje MIC vrednosti uporabili dilucijski test na mikrotitrskih ploščah. Test poteka v polistirenskih ploščah, največkrat s 96 luknjicami ter uporabo tekočega gojišča (slika 1: desno). Plošča lahko vsebuje do 12 redčenj, 6-7 različnih preiskovanih spojin. Ena luknjica služi kot pozitivna kontrola (tekoče gojišče in inokulum) in druga kot negativna kontrola (samo gojišče).

Za hitrejšo in lažjo izvedbo testa s primernimi protimikrobnimi sredstvi za specifične izolate, imajo laboratoriji eno vrsto plošč za po Gramu pozitivne ter drugo vrsto plošč za po Gramu negativne bakterije. Npr. za testiranje urinskega izolata pri infekciji spodnjega urinarnega trakta imajo laboratoriji vnaprej pripravljene plošče s primernim antibiotikom ter dodatke za občutljivejše MO, ki potrebujejo pazljivejše ravnanje. [1] MHB je medij izbora, kot tekoče gojišče pri MIC testih večine, hitro rastočih, aerobnih in fakultativnih MO. Gojišče mora imeti določeno pravo razmerje dvovalentnih kationov,  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ . Ob pripravi gojišča vsaki seriji izmerimo pH, ki mora biti med 7,2 in 7,4 pri sobni temperaturi (25 °C). Pri testiranju občutljivejših organizmov je treba gojišču dodati 2–5 % lizirane (konjske) krvi glede na celotni volumen inokulacijske raztopine. [1]

### 1.2.1. Resazurin

Ali 7-hidroksi-3*H*-fenoksazin-3-on-10-oksid je oksidativno-reduktivni indikator, ki ga uporabljamo pri vrednotenju celične rasti, zlasti za preizkuse s citotoksini. [5] Je temno modro, nefluorescentno in netoksično barvilo, ki se obarva rožnato in fluorescira ob redukciji do resorufina zaradi oksidoreduktaz v živih celicah bakterij. Nadalje se resorufin reducira do hidroksiresorufina (brezbarvna in nefluorescentna indikacija). Sprva so ga uporabljali kot dokazni test za prisotnost bakterij in kvasovk v mleku [5].



**Slika 2:** Reakcijska shema, ki ponazarja redukcijo Resazurina do Resorufina ob prisotnosti oksidoreduktaz (povzeto po [6]).

### 1.2.2. Gojišče krvni agar (KA)

Je neselektivno splošno gojišče. Uporabljajo ga za rast patogenih in nepatogenih bakterij. Zaradi vsebnosti krvi je primerno za gojenje organizmov z visokimi prehranskimi zahtevami. Dodatek krvi pa omogoča tudi ločevanje organizmov na podlagi hemolizne reakcije, ki je pomembna diagnostična značilnost za streptokoke, stafilokoke idr. [7]

### 1.2.3. Tekoči bujon

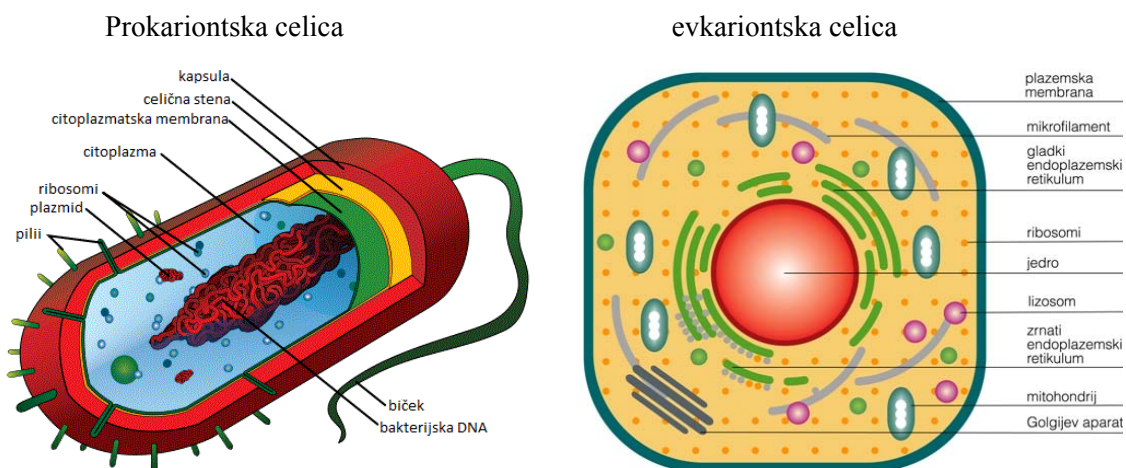
Je neselektivno splošno gojišče. Uporabljamo ga za rast patogenih in nepatogenih bakterij brez posebnih prehranskih zahtev. [7]

### 1.2.4. Inokulacijska raztopina ali inokulum

Je mešanica inokulacijske suspenzije (tj. redčena kultura v fiziološki raztopini), indikatorja (resazurin) in gojišča (MHB 2 CA). [7]

## 1.3. SPLOŠNO O ANTIBIOTIKIH IN BAKTERIJSKI ODPORNOSTI

Antibiotiki so snovi, ki ovirajo razmnoževanje MO ali povzročijo njihovo smrt in so proizvod živih organizmov ali njihovi polysintezni produkti. Imajo bakteriocidno (uničenje celice) ali bakteriostatično delovanje (zaviranje rasti in razmnoževanja). Protibakterijske učinkovine so lahko tudi sinteznega izvora, takrat govorimo o kemoterapevtikih. Novejše protibakterijske učinkovine so večinoma kemoterapevtiki, ki imajo izboljšane antibiotične in farmakokinetične lastnosti [8].



**Slika 3:** Razlike v zgradbi bakterijske in sesalske celice (povzeto po [5]).

Protibakterijske učinkovine razdelimo v skupine glede na mehanizme delovanja in kemično zgradbo. Te učinkovine imajo v bakterijski celici različna tarčna mesta, kjer delujejo kot [8, 9]:

- inhibitorji sinteze celične stene: penicilini, cefalosporini, ostali  $\beta$ -laktami, bacitracin, glikopeptidi (vankomicin);
- inhibitorji sinteze beljakovin: aminoglikozidi (gentamicin), kloramfenikol, tetraciklini, linkozamidi (klindamicin), makrolidi, tiazolidinoni;
- inhibitorji metabolizma (transkripcije, replikacije, zvijanja) nukleinskih kislin: (fluoro)kinoloni;

- inhibitorji dejavnosti (npr. prepustnost) citoplazmatske membrane: daptomicin, imidazoli, polimiksin;
- zaviralci celičnega metabolizma (antimetaboliti): sulfonamidi kot npr. sulfametoksazol, inhibitorji dihidrofolat-reduktaze kot npr. trimetoprim.

Pri iskanju tarč in mehanizmov delovanja novih protibakterijskih učinkovin je treba imeti v mislih lastnosti, ki so zaželeno za idealne protibakterijske učinkovine [8]:

- selektivna toksičnost; učinkovito delovanje na patogeni mikroorganizem, hkrati pa naj ne bi imel strupenih učinkov na človeka (stranski učinki, alergije, spreminjanje učinkovitosti drugega zdravila, ipd);
- širok spekter delovanja; učinkovit naj bi bil na več vrst mikroorganizmov (MO), po možnosti na čim več patogenih MO;
- dolga razpolovna doba v plazmi; takšen Ab je potrebno jemati v daljših časovnih intervalih, kar je ugodno s strani bolnika;
- dobro prehajanje v celice in medcelični prostor;
- visoka afiniteta vezave učinkovine na tarčno mesto, kjer povzroči terapevtski učinek [10];
- šibka vezava na plazemske proteine in v medceličnem prostoru;
- možnost peroralnega jemanja.

Vse več bakterijskih sevov je odpornih proti posameznim ali več različnim protibakterijskim učinkovinam. Vzrok temu je prevelika, neustrezna in nekritična (tudi za spodbujanje rasti pri živalih) uporaba antibiotikov. Okoli leta 1950, ko so na široko uporabljali prvi antibiotik penicilin, je že prišlo do pojava odpornosti bakterij nanj. Odpornost se je najprej pojavila pri *Staphylococcus aureus*, ki je kasneje razvil seve odporne proti meticilinu (MRSA) in tudi že vankomicinu (VRSA) [11]. *S. aureus* je ena izmed nevarnejših patogenih bakterij in najpogostejših povzročitelj bolnišničnih okužb, kot je sepsa. Med pomembnejše odporne seve bakterij, ki povzročajo bolnišnične okužbe, sodijo proti vankomicinu odporen *Enterococcus faecium* in *faecalis* (VRE), *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter baumannii* odporni na karbapeneme ter drugi [8].

## 1.4. BAKTERIJSKA CELICA

Osnovna zahteva za učinkovito in terapevtsko uporabo protibakterijskih učinkovin je njihova selektivna toksičnost, ki učinkovito delujejo le na prokariotsko celico (bakterijska), na evkariotsko celico (sesalska) pa naj ne bi imele toksičnih učinkov [8, 12]. Nekaj bistvenih razlik med prokariotsko in evkariotsko celico:

- Ključna razlika med celicami; bakterijska celica ima celično steno, človeška ne;
- Bakterijska celica nima jedra, človeška ga ima (izjema so eritrociti);
- Pri človeški celici so v citoplazmi prisotni organeli (mitohondriji, kloroplasti, retikulum, Golgijev aparat ...), nasproti bakterijske strukture, ki je dokaj enostavna;
- Biokemijski procesi v bakterijski celici potekajo značilno različno od tistih v človeški celici (bakterija esencialne vitamine večinoma sintetizira, medtem ko jih človek večinoma zaužije s hrano), zato ima bakterija tudi encime, ki te reakcije katalizirajo, medtem ko jih človeška celica nima [12].

### 1.4.1. Celična stena bakterij

Človeška celica ima membrano, bakterijska pa poleg membrane še celično steno, ki je ključna za preživetje bakterije v različnih okoljih, medtem ko človeška ne potrebuje take zaščite. Če bi bakterijo brez stene potopili v vodno okolje z nizko koncentracijo soli (destilirana voda), bi voda prosto vstopila v celico, ki bi nabrekli in počila zaradi vzpostavljanja ravnotežja osmotskega tlaka. Temu pravimo liza celice. Celična stena direktno ne ustavi prenosa vode v celico, preprečuje pa npr. nabrekanje ter ohranja strukturo in s tem posredno preprečuje vnos vode. Stena je seveda dovolj porozna za selektivno prehajanje snovi v ter iz celice in s tem sodeluje pri njenih različnih funkcijah. [12]

#### 1.4.1.1. **Po gramu pozitivne (G+) in po gramu negativne (G-) bakterije**

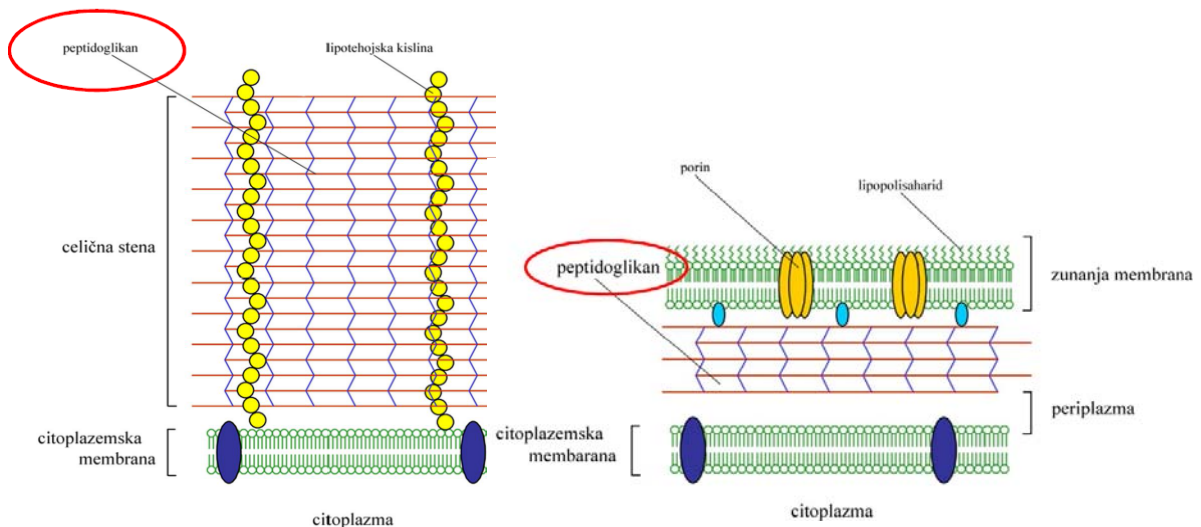
Bakterije karakteriziramo v dve osnovni skupini z metodo barvanja po Gramu in sicer na Gram pozitivne (G+) in Gram negativne (G-). Tehnika temelji na osnovi razlike v zgradbi celične stene med G+ in G- bakterijami. Pri tej tehniki na objektno steklo nanese vzorec, posušen in fiksiran nad ognjem, dodamo barvilo metilvijolično, ki ga nato speremo z acetonom in etanolom. Bakterija z debelejšo celično steno (30–100 nm) absorbira barvilo, katero se ujame v več plasti



peptidoglikana, ostane vijolična in je določena kot gram pozitivna. Bakterija s tanjšo steno (2–7 nm) absorbira manj barvila, ki ga nato z acetonom izperemo ter jo obarvamo z drugim barvilom (fuksin, safranin), ki obarva rdeče. To so gram negativne bakterije. [12]

Stena G<sup>+</sup> bakterij ima poleg peptidoglikana še večje količine teihajske kisline, do 50 % mase stene. Zaradi svoje zunanje lege je ta kislina med drugim pomembna pri pritrtjevanju bakterij na gostiteljske celice. G<sup>-</sup> bakterija ima še tanjšo zunanjo membrano, sestavljeno iz lipopolisaharida, ki pri G<sup>+</sup> ni prisotna [12] in je pripeta z lipoproteini na plast peptidoglikana. Temu pravimo lipidni dvosloj in ima podobno funkcijo kot celična membrana. Preprečuje prost prehod nekaterih snovi v celico in iz nje. Sestavljena je iz disaharidov, polisaharidnega jedra in verige, imenovane O-antigen. V zunanji membrani so prisotni nekateri encimi (fosfolipaze, proteaze) in gradniki ionskih kanalčkov porinov, ki omogočajo prehod manjših molekul (aminokislin, mono-, disaharidov) s pasivno difuzijo. Med obema membranama je periplazemski prostor, kjer so prisotni proteini in prebavni encimi, kar pomeni manjšo prepustnost in otežuje prehod protibakterijskim učinkovam. G<sup>-</sup> bakterije imajo tako kompleksnejšo sestavo celične stene in s tem prisoten večji pojav rezistence na zdravila kot pri G<sup>+</sup> bakterijah [12].

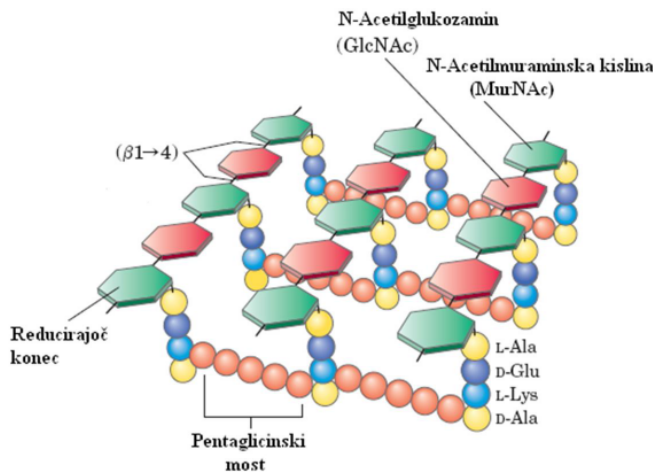
Poznavanje sestave in poteka biosinteze bakterijske celične stene je ključno za razumevanje mehanizma delovanja nekaterih učinkovitih antibiotikov, saj delujejo inhibitorno na nekatere pomembne stopnje v sintezi celične stene. To so predvsem betalaktamski antibiotiki (penicilini, cefalosporini, karbapenemi in monobaktami) [8].



**Slika 4:** Razlike v zgradbi celične stene G<sup>+</sup> (zgoraj) in G<sup>-</sup> (spodaj) bakterij (temnomodro pri G<sup>+</sup> in G<sup>-</sup>: transmembranski protein, svetlomodro pri G<sup>-</sup>: lipoprotein). (povzeto po [9])

### 1.4.1.2. Peptidoglikan in njegova sinteza

Glavni gradnik bakterijske celične stene je peptidoglikan. Ta makromolekula je sestavljena iz dveh ponavljajočih se, med seboj povezanih aminosladkorjev, *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc) in *N*-acetilglukozamina (GlcNAc), z  $\beta$ -1,4 vezjo, na katero deluje encim lizocin. Na MurNAc je pripet oligopeptid, največkrat tetrapeptid L-alanil-(L-Ala)-D-glutaminoil (D-Glu)-*mezo*-diaminopimelinoil (*m-Dpm*) (ali L-lizil (L-Lys))-D-alanin (D-Ala) [8]. Verige so med seboj prečno povezane direktno ali s kratkimi elastičnimi peptidnimi mostički, na mestu 4 ene peptidne verige in mestu 3 druge peptidne verige. Sestava oligopeptida se razlikuje od vrste do



vrste bakterije [13]. Na položaju 1 je najpogosteje L-Ala, na položaju 4 pa D-Ala. Položaja 2 in 3 sta spremenljiva, kjer pri G<sup>+</sup> bakterijah največkrat na 3. mestu najdemo L-Lys, pri G<sup>-</sup> pa *m-Dpm*.

**Slika 5:** Shematski prikaz peptidoglikana in povezave med posameznimi enotami (povzeto po [9]).

Biosinteza peptidoglikana se začne v citoplazmi, notranji strani citoplazmatske membrane, kjer se začnejo sestavljati osnovne gradbene enote. Na zunanjo stran jih prenese poseben lipidni prenašalec, ki kovalentno veže enoto peptidoglikana. Vse skupaj poteka v več stopnjah:

**Biosinteza aktiviranih prekurzorjev**, poteka v citoplazmi v dveh stopnjah. Najprej se iz fruktoze-6-fosfata, sintetizira *N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc).

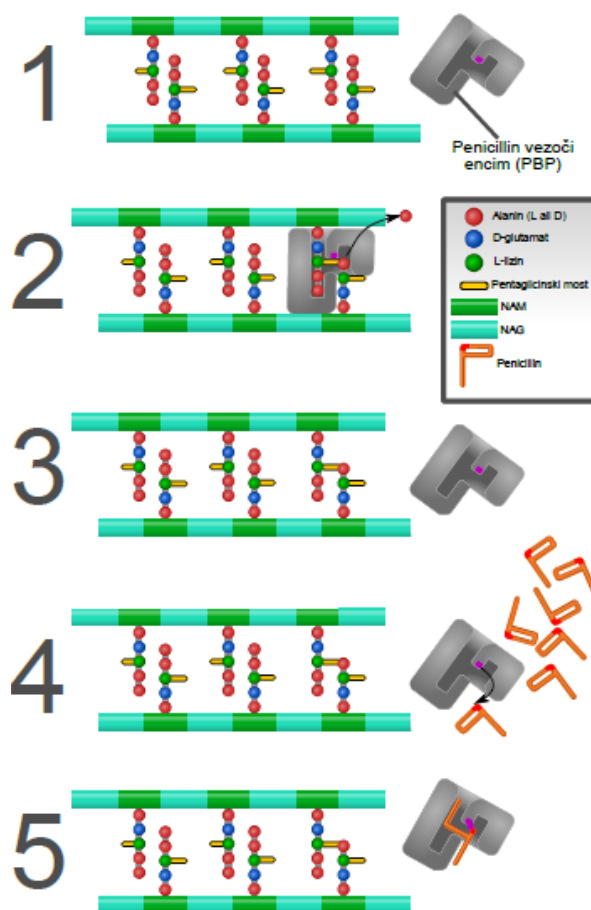
V drugi stopnji iz UDP-GlcNAc nastane UDP-*N*-acetilmuraminska kislina (UDP-MurNAc), kjer sodelujeta encima MurA in MurB. Nato poteka pripenjanje aminokislin, ki ga katalizirajo od ATP odvisni encimi ligaze Mur (MurC, MurD, MurE, MurF). MurF v zadnjem koraku doda dipeptid D-Ala-D-Ala, ki ga sintetizira encim D-alanil: D-alanin ligaza (Ddl). Nastane UDP-*N*-acetilmuramilpentapeptid (UDP-MurNAc-pentapeptid) [14, 15].

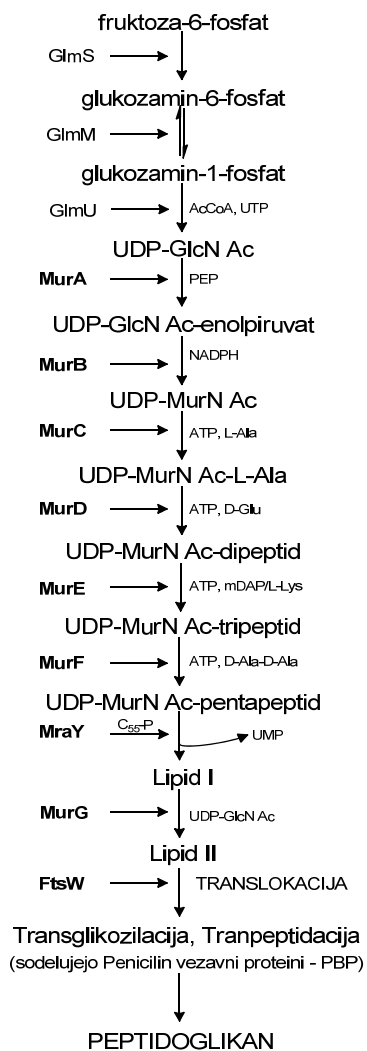
**Vezavo in prenos prekurzorjev skozi citoplazmatsko membrano** omogoča baktoprenol (undekaprenilfosfat - C<sub>55</sub>-P). Na baktoprenol se najprej veže UDP-

MurNAc-pentapeptid, kjer nastane t.i. lipid I, kamor se v drugi stopnji s pomočjo encima MurG pripne še GlcNAc iz UDP-GlcNAc. Nastane t.i. lipid II, ki se nato prenese na zunanjo stran membrane najverjetneje s t.i. flipazo FtsW [8, 16].

### **Vgradnja in polimerizacija peptidoglikanske enote v peptidoglikan**

Med polimerizacijo potekata dve aktivnosti, transglikozilacija in transpeptidacija, ki ju katalizirajo encimi iz skupine penicilin-vezočih proteinov PBP. Pri transglikozilaciji se sladkorne enote povezujejo v verigo, transpeptidacija pa omogoča njihovo prečno premreženje, s čimer se celična stena odebeli. Obe vrsti reakcij katalizirajo bifunkcionalni encimi HMM PBP, ki imajo transglikozilacijsko in tranpeptidacijsko domeno. [14, 17].





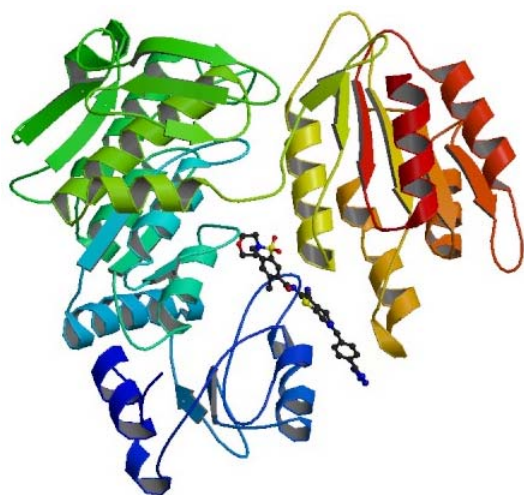
**Slika 6:** levo – shematsko: sinteza peptidoglikana v posameznih stopnjah (izdelano s ChemBioOffice); desno – shematsko: encim transpeptidaza (PBP) z aktivnim mestom (serin) napade karbonilni ogljik na pentapeptidni verigi, pri čemer se odpeci D-Ala, kjer aktiviran intermediat reagira s sosednjo AK na 3. mestu, ter delovanje  $\beta$ -laktamskega antibiotika na PBP (št. 4 in 5) (povzeto po [18]).

## 1.5. MURAMIL LIGAZE (LIGAZE Mur) IN MurF TER NJENA STRUKTURA

Skupina od ATP odvisnih aminokislin, muramil ligaz (MurC, MurD, MurE, MurF) katalizira postopno sintezo UDP-MurNAc-pentapeptida. ATP molekula služi encimom kot vir energije pri različnih znotrajceličnih procesih [22]. Vsak od omenjenih encimov je odgovoren za dodajanje posamezne aminokislina na D-laktoilno skupino molekule UDP-MurNAc iz katere nato nastane pentapeptid.

Ligaza MurF ima sprejeto ime kot UDP-*N*-acetilmuramoil-tripeptid:D-alanil-D-alanin ligaza. Z njenim sodelovanjem v kaskadi reakcij se zaključi sinteza UDP-MurNAc-pentapeptida. Z učinkovitim zaviranjem reakcije prispevamo k nenastanku pentapeptida in posledično liziranju bakterijske celice. Ta beljakovina je ena izmed esencialnih za nastajanje celične stene in primerna tarča za razvoj novih selektivnih protibakterijskih učinkovin - zaviralcev MurF ligaz, saj podobnosti v biologiji s sesalsko celico ni. Bakterijska celica nima alternativne zamenjave gena za izgradnjo encima MurF, kot to lahko stori pri zamenjavi MurC, MurD, MurE, z Mpl encimom, ki v enem koraku doda tripeptid (L-Ala-D-Glu-m-Dpm na UDP-MurNAc [20].

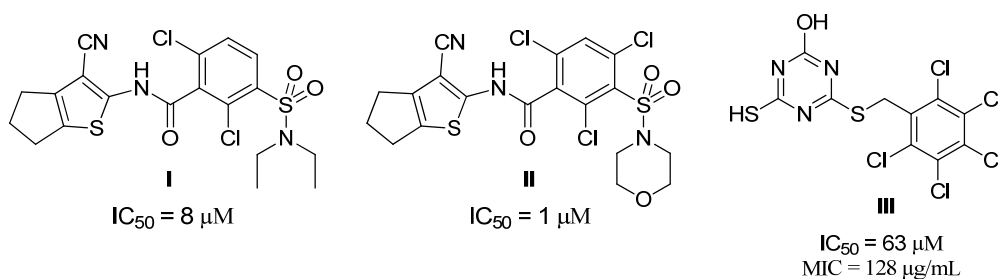
Študija kristalne strukture neaktivirane oblike MurF ligaze je pokazala, da encim gradijo tri povezane odprte domene z  $\alpha/\beta$  ureditvijo plasti, zložene v obliko polmeseca, ki predstavlja širok prostor za vezavo substrata [21]. V primerjavi s kompleksno kristalno strukturo encima MurD, ima MurF specifično obliko *N*-terminalne domene, medtem ko ima centralna in C-terminalna domena podobna vezavna mesta za mono- in dinukleotide kot MurD (Rossmanovo zvitje). Ob vezavi substrata na vezavno mesto encima pride do konformacijske spremembe (slika 7) in s tem aktivacije, s katerim se substrat zapre v notranjost encima [22, 23].



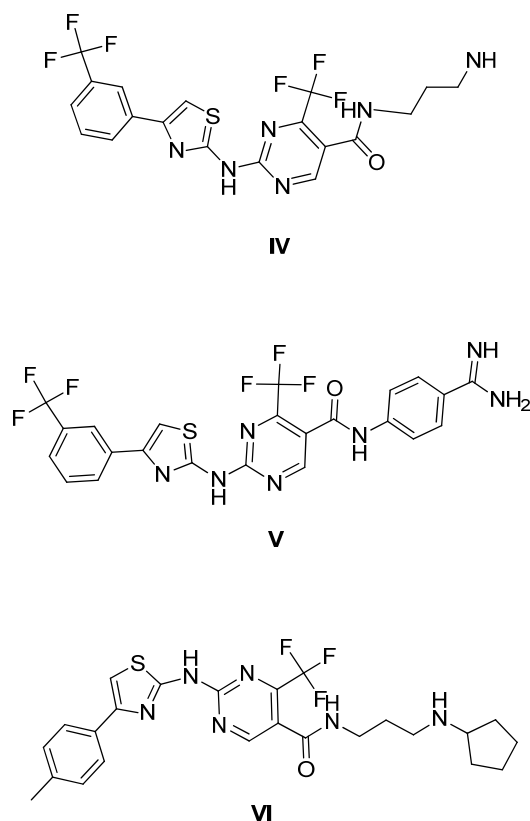
**Slika 7:** Kristalna struktura aktivirane MurF ligaze *S. pneumoniae* v kompleksu s cianotiofenskim inhibitorjem (povzeto po [23]).

### 1.5.1. Inhibitorji MurF

Do danes je bilo predstavljenih že nekaj razredov spojin z inhibicijo encima MurF. Prve pseudo-tri(tetra)peptidne aminoalkilfosfinske kisline, s posnemanjem substrata acilfosfata, so inhibirale encimsko delovanje, vendar brez antibiotičnega učinka [24]. V Abbott Laboratories so s pomočjo virtualnega rešetanja spojin (slika 8: **I** in **II**) prišli do sulfonamidnih inhibitorjev, predstavljenih v člankih [25, 26]. Spojini sta izkazovali inhibitorno delovanje MurF ligaze, vendar brez večjih antibiotičnih učinkov. Johnson & Johnson-ov razvoj tiazolilaminopirimidinskih spojin (slika 9) je kasneje, ob uporabi računalniškega sidranja spojin na vezavna mesta in iskanja potencialnih spojin, privedel do nedavnega odkritja 1, 3, 5-triazinskega derivata (slika 8: **III**) [27].

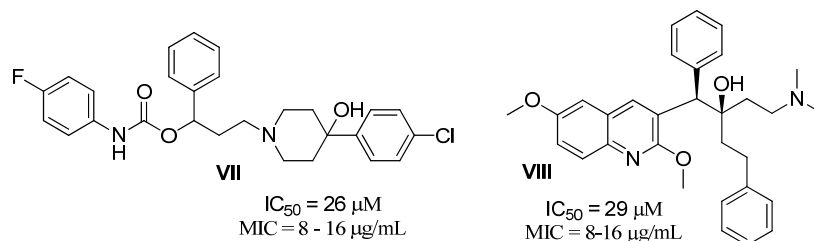


**Slika 8:** 2 izmed prvih sulfonamidnih inhibitorjev MurF (**I** in **II**), ter triazinski derivat, brez antibiotičnega učinka (**III**) (povzeto po [25, 26, 27]).



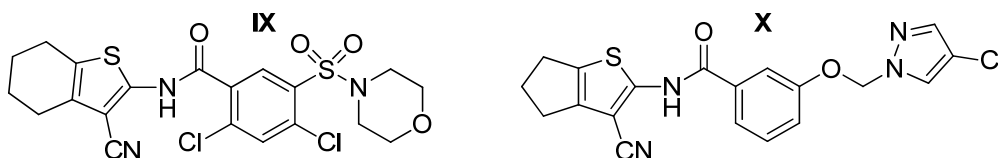
**Slika 9:** Skupina tiazolilaminopirimidinskih inhibitorjev MurF, brez Ab učinka (povzeto po [27]).

Johnson&Johnson-ovo nedavno raziskovanje 8-hidroksikinolonov, ki prav tako izkazujejo inhibitorno delovanje na MurF, je s farmakofornim modeliranjem pripeljalo do razvoja derivata 4-fenilpiperidina ter diarilkinolonov (slika 10). 4-fenilpiperidin je prvi objavljeni inhibitor MurF ligaze *E. coli* z antibiotičnim delovanjem. Diarilkinoloni izkazujejo antibiotično delovanje tudi na MRSA in na vankomicin odporne seve *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* [28, 29].



**Slika 10:** 4-fenilpiperidin - prvi objavljeni antibiotik z delovanjem na MurF (VII) in diarilkinolon (VIII) (povzeto po [28, 29]).

### 1.5.1.1. 2. generacija inhibitorjev MurF zasnovanih na cianotiofenski strukturi [30]



**Slika 11:** Spojina (IX) in (X) raziskovana že v predhodnjih študijah, po kateri so prišli do ključnega cianotiofenskega skeleta 2. generacije inhibitorjev, ki vsebujejo ključne strukturne značilnosti obeh spojin (povzeto po [30]).

Na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani (UNI Ljubljana), Inštitutu za molekularno in celično biologijo ter centru antimikrobnih raziskav v Leedsu (UNI Leeds) in Inštitutu za biokemijo in molekularno ter celično biofiziko v Parizu (UNI Paris) so sintetizirali, razvili in predstavili serijo inhibitorjev MurF iz *S. pneumoniae* ter *E. coli*, zasnovanih na cianotiofenskem skeletu. Spojine imajo nižjo molsko maso, in povečano polarnost glede na prejšnjo generacijo učinkovin, z ohranjenimi inhibitorskimi učinki v nizkih koncentracijah. Najučinkovitejše spojine izkazujejo MIC vrednosti med 4 in 32  $\mu g/mL$ , kar pomembneje prispeva k razvoju učinkovin, ki inhibirajo sintezo peptidoglikana.

## 2. NAMEN DELA

Pri magistrskem delu bomo preverjali inhibitorne učinke optimiziranih cianotiofenskih inhibitorjev 2. generacije, z delovanjem na ligazo MurF, na različnih sevih MO. Z MIC metodo bomo iskali minimalno koncentracijo spojin, ki zavirajo rast bakterij. Preiskovali bomo 26 spojin, predhodno sintetiziranih na FFA (Fakulteti za farmacijo) in FKKT (Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo). Spojine imajo na osnovno ogrodje pripete različne funkcionalne skupine, ki vplivajo na njeno aktivnost pri inhibitornem delovanju. Spojine bomo testirali na 4 sevih bakterij in sicer na:

- *Escherichia coli* (ATTC 47076),
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC 27853)
- *Streptococcus pneumoniae* (ATTC 49619)
- *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923)

Prvi dve bakteriji sta gram negativni (G-) ter drugi dve gram pozitivni (G+).

Delo je delno povzeto ter prirejeno po članku Sarker S.D. in raziskovalcev [5], kjer so uporabili indikator resazurin za bolj natančno določitev minimalne inhibitorne koncentracije ter tudi po članku z že podobno izvedenimi testih na cianotiofenskih spojinah 2. generacije, vendar z različnimi substituenti, Martine Hrast, Marka Anderluha ter ostalih raziskovalcev (Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on cyanothiophene scaffold) [30].



### 3. MATERIALI IN METODE

- **Oprema**

- Sterilne mikrodilucijske plošče z 96 luknjicami (12 x 8) različnih proizvajalcev (Sarstedt, Brand, Thermo Scientific)
- Nastavljive pipete Brand ter sterilni pipetni nastavki (0,2 mL in 1 mL)
- Elektronska (Biohit eLINE) in ročna (Brand) multikanalna pipeta
- Sterilne vialice (3 mL) in mikrocentrifugirke (Eppendorf) (1,5 mL)
- Sterilne posode za inokulacijsko raztopino (60 mL)
- CO<sub>2</sub> posoda ter vrečica za ustvarjanje CO<sub>2</sub> pogojev
- Vibracijski stresalnik Vibromix 10 in 40 (Tehtnica, Slovenija)
- Magnetno mešalo Rotamix (Tehtnica, Slovenija)
- Analitska tehtnica Excellence XS (Mettler Toledo)
- Sterilne paličice za razmaz kulture
- filtri za sterilizacijo (0,22 µm) ter sterilni kvarčni papir

- **Reagenti, spojine, topila, gojišča in kemikalije**

- Sterilno tekoče gojišče Muller Hinton Broth 2 Cation Adjusted (Sigma Aldrich)
- Sterilno trdno gojišče krvni agar (Merck – Blood Agar (base) no.2)
- Etanol 96 % (Sigma Aldrich)
- DMSO 99,7 % (Sigma Aldrich)
- Sterilna raztopina resazurin natrijeve soli (6,75 mg/mL) (Sigma Aldrich)
- Sterilna destilirana voda in fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)
- Sterilna lizirana ovčja kri (Mikrobiol – Sangue Defibrinato Di Montone)
- Antibiotika ampicilin (5 mg/mL) in kloramfenikol (4 mg/mL)

- **Dilucijske metode**

- MIC, metoda določanja minimalne inhibitorne koncentracije spojin

- **Spektroskopske metode**

- UV/VIS spektrofotometer Spektrofotometer Photometer MA 9510, (Iskra, Slovenija) pri 650 nm valovne dolžine, ki meri absorbanco (A) ter

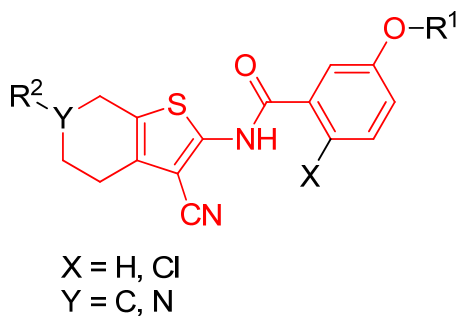
spektrofotometer DensiCHECK™ Plus (BioMérieux Inc.) pri valovni dolžini 580 nm), ki meri celično motnost po Mcfarland standardu (McF)

- **Programska oprema**

- ChemBioOffice 12.0 (CambridgeSoft) za risanje kemijskih struktur

Za potrebe testiranja protimikrobnih učinkov cianotiofenskih inhibitorjev 2. generacije smo uporabili naslednje spojine:

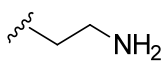
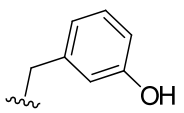
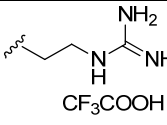
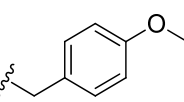
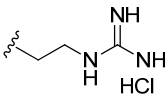
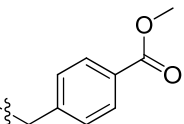
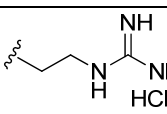
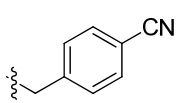
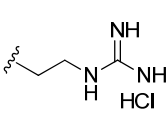
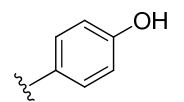
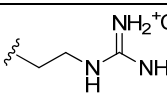
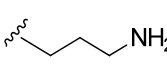
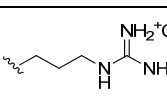
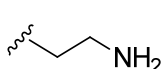
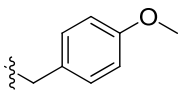
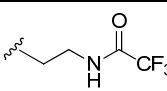
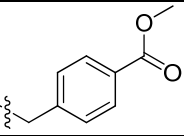
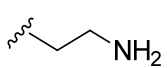
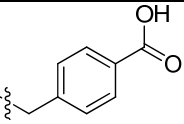
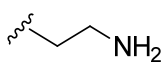
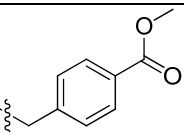
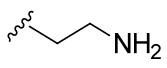
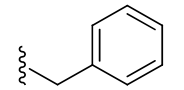
• **Cianotiofenski inhibitorji 2. generacije, tip I**

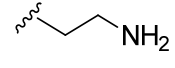
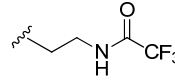
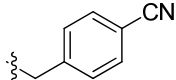
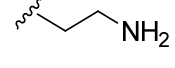
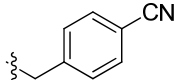
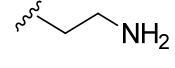
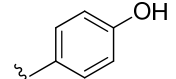


**Slika 12:** Osnovna strukturna formula cianotiofenskih inhibitorjev 2. generacije, tip I.

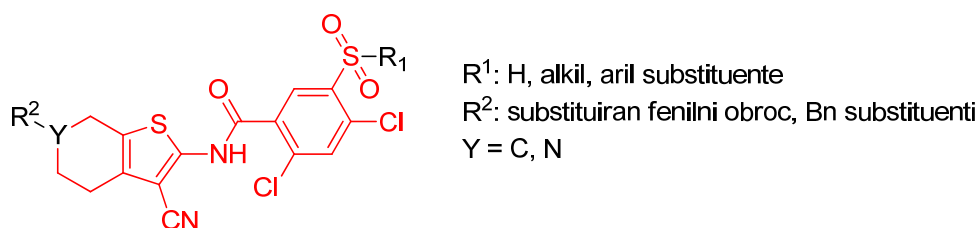
**Tabela I:** Spojine cianotiofenskih inhibitorjev 2. gen. uporabljene pri MIC testih, tip I.

Spojina	Oznaka	X	Y	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	molska masa (MW)
1	ANV-12	Cl	C			375,78
2	ASP-16	H	N			389,47
4	ASP-19	H	C			497,49
5	GMH-359	Cl	N			593,02
6	GMH-361	Cl	N			631,03
7	GMH-364	Cl	N			535,02

8	GMH-366	Cl	N			482,98
9	GMH-369	Cl	N			653,07
10	GMH-368	Cl	N			603,52
11	GMH-378	Cl	N			570,49
12	GDK-119	Cl	C			546,47
13	AM-259	Cl	C		-H	454,37
14	ANV-16	Cl	C		-H	389,90
15	ANV-18	Cl	C		-H	468,40
16	GMH-362	Cl	N			497,01
17	GMH-363	Cl	N			621,03
18	GMH-365	Cl	N			510,99
19	GMH-368	Cl	N			525,02
20	GMH-371	Cl	N			466,98

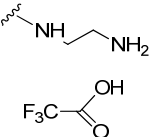

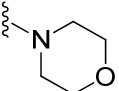
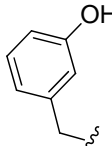
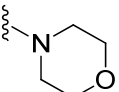
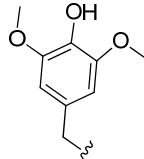
21	GMH-374	Cl	N		-H	376,86
22	GMH-375	Cl	N			588,0
23	GMH-376	Cl	N			491,99
24	GDK-114	Cl	C			467,97

### • Cianotiofenski inhibitorji 2. Generacije, tip II



Slika 13: Osnovna strukturna formula cianotiofenskih inhibitorjev 2. generacije, tip II.

Tabela II: spojine cianotiofenskih inhibitorjev 2. gen. uporabljene pri MIC testih, tip II.

Spojina	Oznaka	Y	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	molska masa (MW)
3	GDK-96	C			587,42
25	GMH-270	N			607,53
26	GMH-274	N			667,58

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1. PRIPRAVA KULTURE (MO)

Kulturo je treba zasejati na standardno trdno ali tekoče sterilno gojišče, npr. krvni agar ali tekoči bujon. Za *E. coli* in *P. aeruginosa* smo za prekonočno inkubacijo uporabili tekoči bujon ter za *S. pneumoniae* in *S. aureus* trdni krvni agar na petrijevkah.

Zamrznjeno kulturo ali še živečo od prejšnjega dne smo s paličicami prenesli in zasejali na gojišče ter inkubirali pri temperaturi 35–37 °C preko noči v aerobnih ali anaerobnih pogojih. Za *E. coli* in *P. aeruginosa* smo uporabili stresalnik pri 100–150 obr/min. Za *S. pneumoniae* smo uporabili CO<sub>2</sub> posodo, kamor smo položili na krvnem agarju zasejano kulturo, skupaj z vrečico, ki je z vezavo zračnega kisika ustvarila CO<sub>2</sub> (anaerobne) pogoje. Za druge MO je priprava kulture potekala v aerobnih pogojih.

### 4.2. PRIPRAVA GOJIŠČA

Gojišče MHB 2 (CA) je bilo za izvedbo te metode 3,3-krat koncentrirano, kar pomeni da smo v 100 mL destilirane vode v čaši, zmešali 7,26 g tega gojišča. Segrevali ter mešali smo s pomočjo magnetnega mešala. Suspenzija ni smela zavreti. S segrevanjem in mešanjem se škrob počasi raztopi. Nato smo vsebino avtoklavirali po navodilih proizvajalca (1–2 bar, 115–121 °C za 10 minut), da smo dosegli sterilizacijske pogoje ter s to izvedbo pazili, da ni prišlo do pregretja gojišča. Gojišče smo prelili v sterilno steklovino in zamašili. Ker gre za kationsko umerjeno gojišče, vsebuje soli, ki zagotavljajo 20–25 mg/L kalcija in 10–12,5 mg/L magnezija, da ustreza kriterijem uporabe.

### 4.3. PRIPRAVA RESAZURINA

V stekleno 100 mL čašo smo zatehtali 337,5 mg natrijevega resazurinata ter dodali 50 mL destilirane vode. Koncentracija soli je bila 6,75 mg/mL. Vsebino smo zmešali ter izvedli sterilizacijo s filtracijo (filter premera por 0,22 µm) v sterilno plastično 50 mL vialo.

#### 4.4. PRIPRAVA INOKULACIJSKE SUSPENZIJE

(MO redčen v fiziološki raztopini) za:

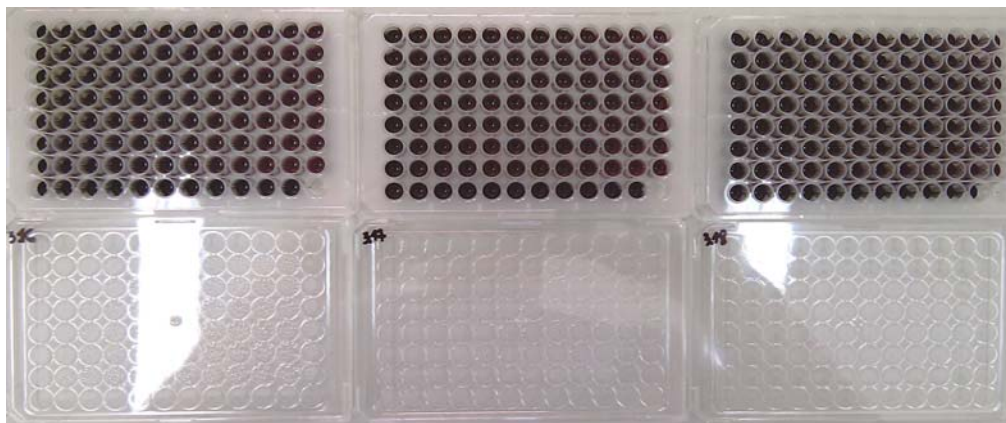
- *E. coli* in *P. aeruginosa*:

Iz prekonočne kulture smo vedno pripravljali inokulacijsko suspenzijo z optično gostoto (OD) 0,132 izmerjeno s spektrofotometrom pri valovni dolžini 650 nm ( $OD_{650}$ ) ter jo nato redčili 20-krat, da smo dosegli gostoto celic približno  $5 \cdot 10^6$  CFU/mL. Suspenzijo smo uporabili za pripravo inokulacijske raztopine. Pri 10 testnih spojinah je bilo treba pripraviti 11 mL suspenzije.

Primer: V kolikor je bil  $OD_{650}$  prekonočne kulture 3,0 pomeni, da je bilo potrebno **23-kratno** redčenje kulture, da je  $OD_{650}$  ustrezal 0,132 ter nato še **20-kratno** redčenje za pripravo inokulacijske suspenzije. V primeru direktne priprave smo prekonočno kulturo v fiziološki raztopini redčili direktno, to je **460-krat**. V našem primeru, smo ob pripravi 11 mL inokulacijske suspenzije dodali v 11 mL fiziološke raztopine 24  $\mu$ L prekonočne kulture.

- *S. pneumoniae* in *S. aureus*:

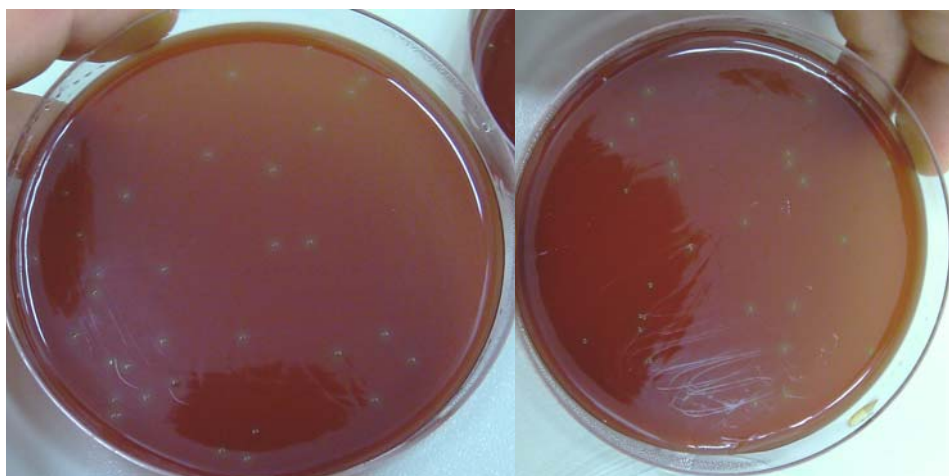
Pri testiranju spojin na obeh sevih MO smo imeli težave pri ugotavljanju MIC vrednosti, saj se MO po nacepitvi plošč z inokulacijsko raztopino ter 24-urni inkubaciji ni razmnoževal in je celota plošča ostala temno modra (slika 14). Ob tem smo uporabljali inokulacijsko suspenzijo z 0,5 McF-ja pri obeh MO, merjeno s spektrofotometrom za merjenje motnosti (DensiCHECK™ Plus), kar pa se je izkazalo za prenizko vrednost (slika 14). Zato smo ugotovili CFU vrednost (slika 15), ki je pokazala, da pri 0,5 McF v inokulacijski suspenziji oba seva vsebujeta približno  $3 \cdot 10^6$  CFU/mL. Koncentracijo smo povečali za 10-krat in pri testiranju ugotovili rast obeh sevov (slika 16). Tako smo nato vedno pripravili ter uporabljali inokulacijsko raztopino s 5 McF, kar je približno ustrezalo  $OD_{650} = 0,72$ .



**Slika 14:** Neuspela 24-urna inkubacija nacepljene plošče z 0,5 McF *S. pneumoniae*.

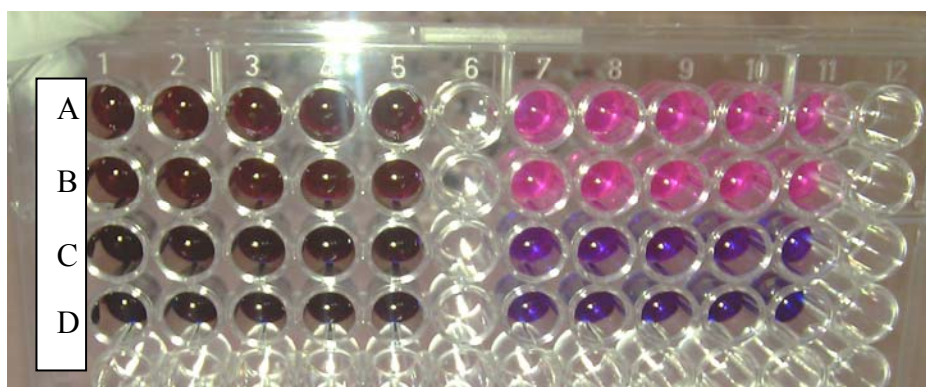
#### 4.5. ISKANJE GOSTOTE CELIC *S. pneumoniae* IN *S. aureus* PRIMERNE ZA MIC TEST

Pri ugotavljanju števila bakterij smo uporabili metodo CFU (colony forming units). 100  $\mu$ L posamezne kulture z 0,5 McF smo v Eppendorf epruvetki razredčili v 900  $\mu$ L fiziološke raztopine. To je bila 1. redčitev. Iz nje smo odpipetirali 100  $\mu$ L redčene kulture in jo razredčili v 900  $\mu$ L fiziološke raztopine. To je bila 2. redčitev. Postopek smo ponovili še za 3., 4. ter 5. redčitev. Iz 5. redčitve smo iz 1 mL pripravka vzeli 100  $\mu$ L ter prenesli na petrijevki v 2 paraleli (slika 15). Na petrijevkah je bilo po 24 urah 29 ter 33 kolonij. Če preračunamo začetno št. celic v 0,5 McF-ja je to  $2,9 \times 10^6$  ter  $3,3 \times 10^6$  CFU/mL.



**Slika 15:** 100  $\mu$ L, 5. redčitve *S. pneumoniae*, po prekonočni inkubaciji na krvnem agarju, v dveh paralelkah pokaže, da je koncentracija celic približno  $3 \times 10^6$  CFU v 0,5 McF premajhna za rast kulture pri določanju MIC neznamim spojinam. Analogno smo test izvedli za *S. aureus*.





**Slika 16:** Poizkus nacepljene plošče z različnimi konc. MO, kjer je razvidna rast oz. kolikšna je potrebna gostota celic za uspešno rast MO (rdeče oz. roza obarvanje). Od A proti D: 5; 4; 1; 0,5 McF. Na levi polovici je *S. pneumoniae*, desno *S. aureus*.

#### 4.6. PRIPRAVA INOKULACIJSKE RAZTOPINE (INOKULUM)

Pri pripravi inokulacijske raztopine smo vedno preračunali potreben volumen komponent (inokulacijske suspenzije (MO), gojišča in indikatorja), glede na št. testiranih spojin. V enem dnevu smo ravnali z enim MO ter s 5–10 spojinami.

##### PRIMER ZA 10 SPOJIN:

Treba je bilo pripraviti 55 mL inokulacijske raztopine od tega 11 mL inokulacijske suspenzije, 11 mL indikatorja (resazurin) ter 33 mL gojišča (MHB 2, CA)

V plastično sterilno posodico z nosilnim volumnom 60 mL smo z elektronsko pipeto odpipetirali 33 mL gojišča. V primeru seva *S. pneumoniae* je od 33 mL gojišča predstavljalo 16 % lizirane ovčje krvi. Nato smo dodali 11 mL indikatorja ter na koncu 11 mL inokulacijske suspenzije.

**Tabela III:** Tabela raztapljanja učinkovin, kjer je glede na zatehto, preračunan dodatek vode in DMSO v  $\mu\text{L}$  ter končne koncentracije spojin, iz katerih smo nato z redčitvami dosegli delavno koncentracijo spojin z  $256 \mu\text{g/mL}$ .

spojina	zatehta sp.[mg]	V topila [ $\mu\text{L}$ ] = V(DMSO) + V(voda)			c[ $\mu\text{g/mL}$ ] po dod. top.	redčitev za c = $256 \mu\text{g/mL}$	delež DMSO v vz.	delež DMSO v 1. stolpcu ob konc. $256 \mu\text{g/mL}$ [%]
		DMSO	voda	skupaj				
ASP-16	5,66	1205	3215	4420	1280	5x	0,27	5,5
GDK-96	3,90	319	900	1219	3200	12,5x	0,26	2,1
ASP-19	1,17	457	914	1371	1280	5x	0,33	6,7
GMH-359	3,00	730	1703	2433	1280	5x	0,30	6,0
GMH-361	4,85	1097	2691	3788	1280	5x	0,29	5,8
GMH-362	3,26	3825	1273	5098	640	2,5x	0,75	30,0
GMH-363	4,07	4883	1477	6360	640	2,5x	0,77	30,7
GMH-364	10,32	806	202	1008	10240	40x	0,80	2,0
GMH-365	5,36	3750	1628	5378	1000	2,5x	0,70	27,9
GMH-366	2,37	926	926	1852	1280	5x	0,50	10,0
GMH-368	3,05	2384	596	2980	1023	4x	0,80	20,0
GMH-369	4,04	316	1091	1407	2870	11x	0,23	2,0
GMH-371	3,01	4114	588	4702	640	2,5x	0,87	35,0
GMH-374	2,53	2969	989	3958	640	2,5x	0,75	30,0
GMH-373-2	3,13	245	367	612	5120	20x	0,40	2,0
GMH-375	3,54	4142	1382	5524	640	2,5	0,75	30,0
GMH-376	3,78	4426	1476	5902	640	2,5	0,75	30,0
GMH-378	4,05	317	474	791	5120	20x	0,40	2,0
GDK-114	1,84	718	719	1437	1280	5x	0,50	10,0
GDK-119	3,80	297	445	742	5120	20x	0,40	2,0
GMH-270	2,84	2102	666	2768	1024	4x	0,76	19,0
GMH-274	2,54	2667	1297	3964	640	2,5	0,67	26,9
ANV-12	5,61	438	110	548	10240	40x	0,80	14,8
AM-259	4,48	350	525	875	5120	20x	0,40	2,0
ANV-16	5,01	391	98	489	10240	40x	0,80	4,0
ANV-18	5,67	443	111	554	10240	40x	0,80	4,0

## 4.7. PRIPRAVA MIKRODILUCIJSKE PLOŠČE

Shema 1: Pripravljena ploščica za testiranje spojin z MIC metodo.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	učinkovina 128 µg/mL	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	Brez uč. (samo voda + Inokula- cijska Suspen- zija)
B	2. paralelka											
C	3. paralelka											
D	4. paralelka											
E	5. paralelka											
F	raztopina DMSO											
G	Antibiotik 2, 5 oz. 2 mg/mL	1,25 1	0,62 0,5	0,31 0,25	0,16 0,125	0,078 0,062	0,039 0,031	0,019 0,016	0,010 0,0078	0,0049 0,0039	0,0024 0,0019	
H	uč.+indikator voda+gojišče											12H

- A-E - testirana spojina v 5 ponovitvah, v seriji redčitev od 1.-11. stolpca (testirana učinkovina + gojišče + indikator + MO)
- F - kontrola zaviranja rasti MO zaradi prisotnosti DMSO (brez testne spojine) v enaki koncentraciji DMSO, kot v stolpcu 1 pri testnih spojinah (z redčitvami se je konc. DMSO zmanjševala v vrsti F od 1. do 11.)
- G - pozitivna kontrola (ampicilin ali kloramfenikol v seriji redčitev + gojišče + indikator + MO)
- H – test sterilnosti (testna spojina v seriji redčitev + gojišče + FR + indikator), brez MO
- 12. stolpec – negativna kontrola (destilirana voda + gojišče + indikator + MO), v 12.H je samo 70 µL vode + 30 µL gojišča

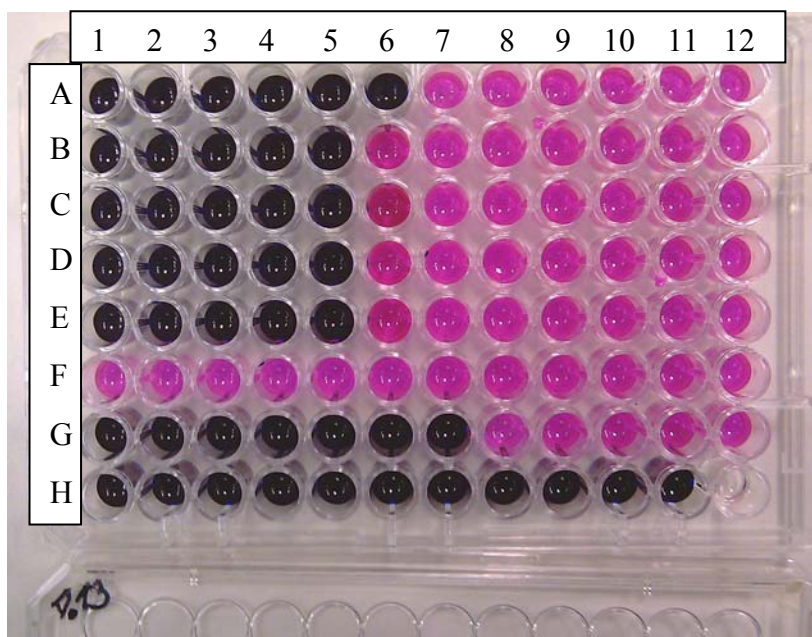
### 4.7.1. Postopek priprave ploščice:

- 1) V 1. stolpec smo odpipetirali 100 µL raztopljene učinkovine v koncentraciji 256 µg/mL, v luknjice od A do E ter H in z multikanalno pipeto 50 µL sterilne destilirane vode, od 2. do 12. stolpca, v vse luknjice (A do H). V 1.F smo vnesli 100 µL DMSO v koncentraciji, ki raztaplja učinkovino (kontrola vpliva DMSO) ter v 1.G 100 µL širokospektralnega antibiotika znane koncentracije (ampicilin 5mg/mL in kloramfenikol 4 mg/mL).

- 2) Z multikanalno pipeto smo iz 1. stolpca vseh luknjic, odvzeli 50  $\mu\text{L}$  vsebine in jo ob steni previdno preneseli v 2. stolpec ter zavrgli pipetne nastavke. S svežimi sterilnimi nastavki smo premešali vsebino 2. stolpca ter preneseli v 3. ter spet zavrgli nastavke in tako ponavljali vse do 11. stolpca, iz katerega smo na koncu odstranili 50  $\mu\text{L}$  vsebine.
- 3) V vsako luknjico od A do G od 1. do 12. stolpca, smo z multikanalno pipeto odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  prej pripravljene inokulacijske raztopine, ki je mešanica indikatorja (Resazurin), inokulacijske suspenzije (npr. MO z OD 0,132 ter še 20x redčen s FR) in gojišča\* (MHB II, Cation Adjusted).
  - Torej vsaka omenjena luknjica je sedaj vsebovala še:  
10  $\mu\text{L}$  indikatorja + 10  $\mu\text{L}$  inokulacijske suspenzije + 30  $\mu\text{L}$  gojišča\*
- 4) Za vrstico H smo v Eppendorf epruvetki pripravili 600  $\mu\text{L}$  raztopine brez kulture (120  $\mu\text{L}$  indikatorja + 120  $\mu\text{L}$  destil. vode + 360  $\mu\text{L}$  gojišča) in odpipetirali po 50  $\mu\text{L}$  od 1. do 11. luknjice. V 12.H smo dodali le 20  $\mu\text{L}$  destilirane vode in 30  $\mu\text{L}$  gojišča\* (MHB II, Cation Adjusted).
  - Torej vsaka omenjena luknjica (razen 12.H) je sedaj vsebovala še:  
10  $\mu\text{L}$  indikatorja + 10  $\mu\text{L}$  destilirane vode + 30  $\mu\text{L}$  gojišča\*

\*Pri *S. pneumoniae* smo zaradi njene občutljivosti in visokih prehranskih zahtev morali dodati lizirano ovčjo kri. Tako je od volumna gojišča (30  $\mu\text{L}$ ) predstavljalo 16 % krvi, kar je na celotni volumen vsebine v luknjici predstavljalo 4,8 % krvi.

Na koncu je vsaka luknjica MIC plošče vsebovala 100  $\mu\text{L}$  skupnega volumna. Ploščo smo pokrili s steriliziranim kvarčnim papirjem, ki se je prilegal obliki plošče ter zaprli s pokrovom, ki ji je pripadal. Inkubirali smo jo 24 h pri temperaturi 35–37°C.



**Slika 17:** Primer; Mikrodilucijska plošča po 24h, modificirana z resazurinskim indikatorjem. Temnomodro obarvanje pomeni zaviranje rasti, roza pomeni rast MO (*E. coli*). A-E - testirana spojina (št.13) v 5 ponovitvah (v seriji redčitev od 1-11+ gojišče + indikator + MO); F - kontrola rasti MO (brez testne spojine) v določenem razmerju DMSO/voda, kot je v 1. stolpcu pri testnih spojinah, ter v seriji redčitev; G - pozitivna kontrola (ampicilin v seriji redčitev + gojišče + indikator + MO); H – test sterilnosti (testna spojina v seriji redčitev + gojišče + FR + indikator), brez MO; stolpec 12 – negativna kontrola (destilirana voda + gojišče + indikator + MO).

#### 4.7.2. Pozitivna kontrola

Za pozitivno kotrolo smo uporabili širokospektralna antibiotika ampicilin s koncentracijo 5 mg/mL ter kloramfenikol s koncentracijo 4 mg/mL. Prvega smo uporabili za *E. coli* ter drugega za ostale seve bakterij. Kontrolo smo izvajali na vsaki ploščici v vrstici G. Stopnjo občutljivosti bakterijskega seva smo ugotovili tako, da smo izmerjene vrednosti primerjali s podatki za posamezne antibiotike in bakterije v razpredelnih standardov [31]. Stopnjo občutljivosti izrazimo kot:

- S = občutljiv (*sensitive*) – z običajnim odmerkom antibiotika dosežemo inhibitorno koncentracijo zdravila v krvi.
- I = zmerno občutljiv (*intermediate*) – močno povešan odmerek zdravila bo morda učinkovit, sicer je potrebno določiti MIC.
- R = neobčutljiv ali odporen (*resistant*) – dosežena koncentracija v krvi ne zavira bakterije.

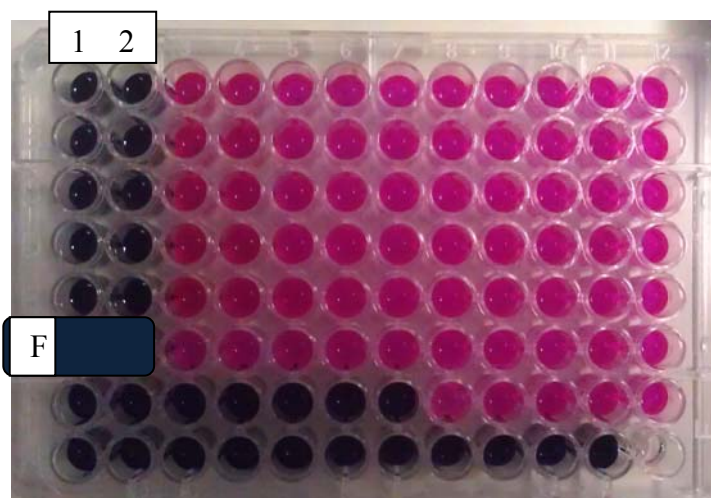
Na sliki 17, v vrstici G vidimo primer zaviranja rasti kulture *E. coli* med 7. in 8. redčitvijo, kar ustreza MIC vrednostim antibiotika, kot ga podaja CLSI standard, to je med 8 in 32 mg/mL [31]. Analogno velja za ostale pozitivne kontrole zaviranja rasti MO z znanim širokospektralnim antibiotikom. Z določanjem in odčitavanjem MIC vrednosti za znane antibiotike na izbrane seve MO nismo imeli težav.

**Tabela IV:** MIC vrednosti za antimikrobna sredstva na izbrane seve MO (povzeto po 31).

Testirani sev	Antimikrobno sredstvo	Interpretativni MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ] Standard		
		S	I	R
PENICILINI				
<i>E. coli</i>	ampicilin	$\leq 8$	16	$32 \geq$
FENIKOLI				
<i>P. aeruginosa</i>	kloramfenikol	$\leq 8$	16	$32 \geq$
<i>S. pneumoniae</i>	kloramfenikol	$\leq 4$	-	$8 \geq$
<i>S. aureus</i>	kloramfenikol	$\leq 8$	16	$32 \geq$

#### 4.7.3. Kontrola vpliva topila na zaviranje rasti MO

V Vrstici F vsake ploščice smo kontrolirali vpliv topila DMSO na zaviranje rasti MO. Ker je bila preiskovana spojina raztopljena v določeni koncentraciji oz. razmerju DMSO/voda, smo to razmerje simulirali v vrstici F (slika 17, 18). Razmerje je podano v tabeli 3, v zadnjem stolpcu, "delež DMSO v 1. stolpcu, ob konc. spojine 256  $\mu\text{g/mL}$ ". Nekatere lipofilne spojine je bilo potrebno raztopiti v večjem deležu DMSO-ja, kar pa je privedlo do vpliva zaviranja rasti zaradi prisotnosti DMSO (slika 18).



**Slika 18:** Primer, kjer je razviden vpliv DMSO pri zaviranju rasti bakterije (*E. coli*) v vrstici 1F in 2F, kjer topilo ne sme vplivati na zaviranje rasti in bi se moral indikator resazurin razbarvati do roza barve.

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. REZULTATI MIC

V tabeli V smo zbrali rezultate testiranja spojin in njihovih MIC vrednosti na izbrane seve. Vidimo, da spojine izkazujejo različne inhibitorne učinke. Ob raztapljanju spojin se je izkazalo, da se nekatere spojine ne topijo oz. slabo topijo v DMSO ob dodatku vode. Podobne težave, zaradi višje lipofilnosti so se že pojavljale pri spojinah vodnicah, iz katerih so nastali testirani analogi in so strukturno podobni (slika 11: ClogP (**IX**) = 2,82, and ClogP (**X**) = 3,40), kar navajajo tudi članki [30]. Potrebno je bilo redčenje samo v DMSO, kar je povzročalo težave pri določanju MIC.

**Tabela V:** Rezultati MIC vrednosti testiranih spojin na seve bakterij.

št. spojine	Kultura	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>
	Spojina	MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ]
1	ANV-12	>128	>128	128	>128
2	ASP-16	>128	>128	>128	>128
3	GDK-96	64	>128	128	64
4	ASP-19	64	128	128	16
5	GMH-359	>128	>128	>128	>128
6	GMH-361	>128	>128	>128	>128
7	GMH-364	>128	>128	>128	>128
8	GMH-366	>128	128	128	>128
9	GMH-369	32	128	64	16
10	GMH-373-2	128	>128	64	32
11	GMH-378	128	>128	64	64
12	GDK-119	>128	>128	16	16
13	AM-259	8	64	64	8
14	ANV-16	64	128	/	32
15	ANV-18	64	64	32	16
16*	GMH-362	128	64	/	64
17*	GMH-363	128	64	/	128
18*	GMH-365	128	64	/	64
19*	GMH-368	128	128	/	64
20*	GMH-371	64	64	/	64
21*	GMH-374	128	64	/	64
22*	GMH-375	128	64	/	128
23*	GMH-376	128	64	/	128
24	GDK-114	>128	>128	32	16
25*	GMH-270	>128	>128	/	>128
26*	GMH-274	>128	128	64	>128

\* spojine (od 16–26 brez 24) so pri koncentraciji 128  $\mu\text{g/mL}$  topne v višji konc. DMSO (19–35 % - tabela 3), kjer pa že samo topilo zavira rast bakterij v 1. in tudi 2. stolpcu. Kontrola zaviranja rasti zaradi prisotnosti topila je opravljena v vrstici F (slika 18) in kaže na vpliv topila.

## 5.2. KOMENTAR

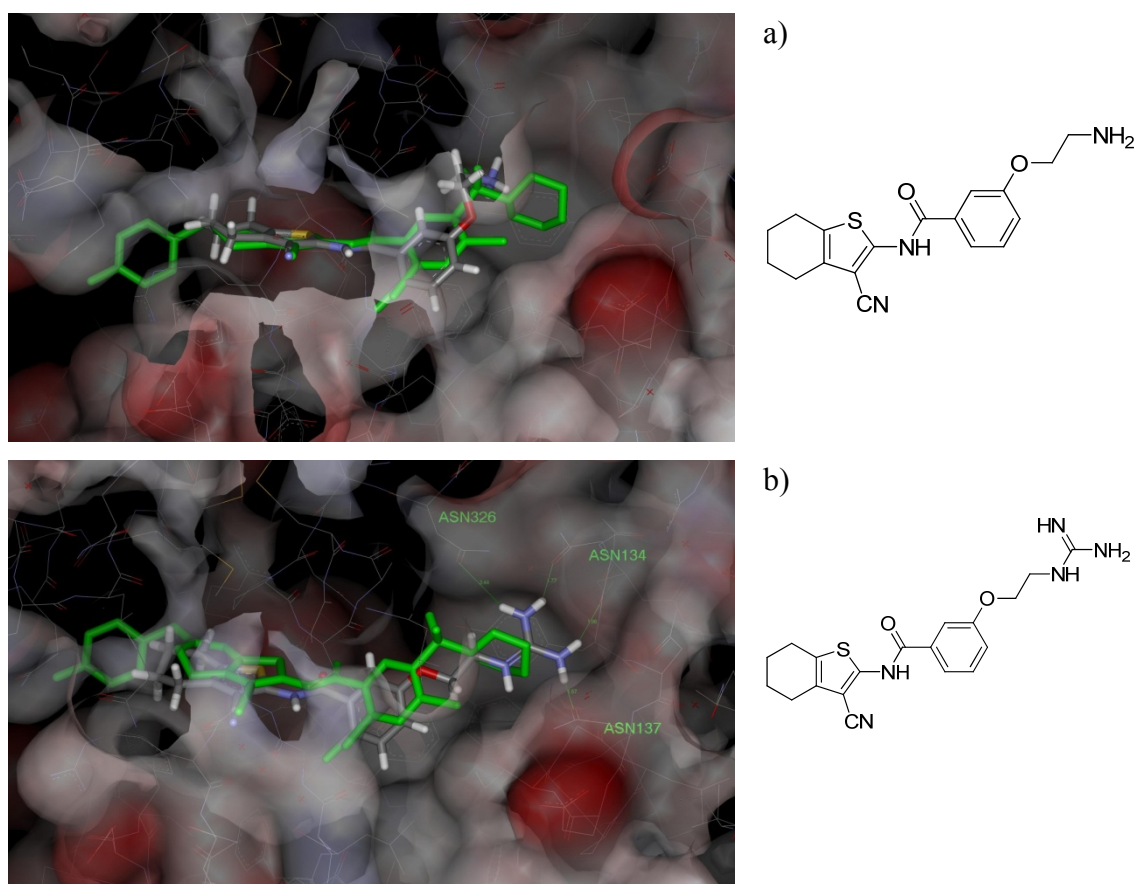
Zaključne ugotovitve o protibakterijskem delovanju spojin smo zbrali v tabeli V. Nekatere spojine izkazujejo izrazitejše protibakterijsko delovanje. Spojina 13 ima izmed vseh najizrazitejše zaviralno delovanje ter najnižje MIC vrednosti na izbrane seve MO. Zaviralni učinek  $\leq 128 \mu\text{g/mL}$  na vseh testnih sevih je bilo zaznati tudi pri spojinah 4, 9, 14 in 15. Spojina 12 in 24 prav tako izkazujeta izrazitejše protibakterijsko delovanje, vendar le na G+ bakterijah, *S. pneumoniae* in *S. aureus*. Manjšo aktivnost zaviralnega delovanja opazimo še pri spojinah 1, 3, 8, 10 in 11, vendar ne pri G- bakteriji, *P. aeruginosa* (izjema 8). Spojine 5, 6, 7 niso pokazale inhibitornega učinka. Spojine 16 do 23, 25 in 26 so pokazale inhibitorni učinek v isti vrednosti, kot ga je kontrola vpliva DMSO topila na zaviranje rasti, tako da ne moremo oceniti pravega zaviralnega učinka teh spojin.

Spojini 13 in 15 sta strukturno zelo podobni in vsebujeta na  $-R^1$  mestu gvanidinski substituent, ki z vezavnim mestom encima Asn 134, Asn 137 in Asn 326, predvidoma tvori ionsko in 4 vodikove vezi (slika 19) in izkazujeta najmočnejše protibakterijsko delovanje. Spojina 13 vsebuje etilengvanidinsko, spojina 15 pa propilengvanidinsko skupino. Kot kaže, podaljševanje verige na tem mestu zmanjšuje protimikrobni učinek in domnevamo, da spojina postaja predolga za vezavni žep encima. Metilengvanidinski substituent vsebuje še 4. in 9. do 12. spojina. Spojina 4 nima vezanega klora na X mestu, spojine 9 do 12 imajo na  $-R^2$  mestu vezane različne fenilne derivate, kar lahko vpliva na konformacijo molekule ter optimalno velikost molekule in s tem tudi afiniteto vezave z encimom. Na  $-R^2$  ima 9. spojina vezano 4-metoksibenzilno skupino, ki ne tvori H vezi v aktivnem mestu encima, 12. spojina pa fenolni substituent, ki z vezavnim mestom ustvari močno H vez. Posledica tega je močnejše protibakterijsko delovanje v primerjavi s spojino 9. Spojine 5, 6 in 7 niso izkazale nobene zaviralne aktivnosti. 5 in 6 imata na R1 mestu vezano trifluoroacetamidoetilno skupino, ki z vezavnim mestom najbrž ne tvori močnih vezi.



Spojine 1, 3, 8, 14 in 24 so izkazale zaviralni učinek in imajo na  $-R^1$  mestu vezano aminske skupino, ki z encimom tvori 2 vodikovi vezi.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da sta spojini 13 in 15 z vezano gvanidinsko skupino na mesto  $-R^1$  izkazovali najizrazitejše protibakterijsko delovanje. Šibkejši protibakterijski učinek opazimo pri spojinah z aminskimi substituenti na mestu  $-R^1$ . Pri spojinah, ki nimajo substituentov z možnostjo ionizacije in/ali nastankom močnih vodikovih vezi, je protimikrobno delovanje skromnejše. Domnevamo, da je to posledica šibkejšje vezave inhibitorja v aktivno mesto encima MurF.



**Slika 19:** Cianotiofenski inhibitorji – z molekulskim sidranjem predvidena vezava v aktivno mesto encima MurF, *S. pneumoniae* sidrani učinkovini a in b, z zeleno obarvanim kokristaliziranim inhibitorjem (povzeto po [25]).

Če povzamemo eksperimentalno delo in ga primerjamo s člankom [25] s sorodnimi preizkusi ugotavljanja MIC vrednosti, je njihova študija prav tako dokazala obetavno protibakterijsko delovanje nekaterih spojin. Najizrazitejše protibakterijsko delovanje so izkazovale prav spojine s pripeto gvanidinsko substituentom. Spojine z aminskimi substituenti na mestu  $-R^1$  so izkazovale šibkejšo protibakterijsko delovanje. Vendar pa kljub zamenjavi aminske skupine z gvanidinskim substituentom, najučinkovitejše spojine niso izkazovale bitveno boljše protibakterijske aktivnosti ( $IC_{50}$ ), kot njihovi aminski analogi, a v okviru magistrske naloge  $IC_{50}$  nismo določali. Testirane spojine niso ščitene s patentnimi aplikacijami in gre za vir spojin, ki niso še razvite do ustrezne stopnje. Spojine pa so prav tako že objavljene v publikaciji.

## 6. SKLEP

Pri magistrski nalogi smo se osredotočili na ugotavljanje protibakterijskega delovanja optimiziranih cianotiofenskih zaviralcev 2. generacije, z delovanjem na ligazo MurF. Ugotavljali smo minimalno koncentracijo, ki zavira rast bakterij (MIC vrednosti), 26 spojinam s potencialnimi protimikrobnimi učinki, ki smo jih pridobili na FFA (Fakulteti za farmacijo, UNI Lj). Testirane bakterije so bile naslednje: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* in *Staphylococcus aureus*.

Spojine smo sprva raztopili v DMSO ter v nadaljnih redčenjih z vodo. Ob tem je pri nekaterih spojinah prihajalo do precipitacije. Pojavljale so se težave z raztapljanjem, zaradi lipofilnosti spojin. Precipitaciji smo se izognili tako, da smo ohranjali višji delež DMSO ob dodajanju raztopine homogene zmesi DMSO/voda. Pri povečanem deležu DMSO je pri redčitvah nekaterih spojin prihajalo do vpliva topila na zaviranje rasti MO. Vpliv DMSO smo simulirali na mikordilucijski ploščici v vrstici F, za vsako spojino in sev posebej. Pri delu smo se osredotočili le na en sev posamično ter nato na njem izvedli MIC teste z vsemi spojinami. Za indikacijo rasti ter bolj natančno določitev MIC smo uporabili indikator resazurin, kot v člankih z že podobno izvedenimi testi [5]. Za določanje MIC spojinam na sevih *E. coli* ter *P. aeruginosa* nismo imeli težav pri izvedbi testov. Pri *S. pneumoniae* in *S. aureus* so se pojavljale težave pri rasti kulture. Ob že inkubiranem sevu po 24 h, pri temperaturi 35–37 °C, rasti MO ni bilo. Potrebno je bilo prilagoditi oz. povečati začetno gostoto celic, s čimer smo uspešno nadaljevali teste. *S. pneumoniae* ima zahtevne prehranske pogoje ter je hkrati zelo občutljiv MO pri *in vitro* testiranjih. Kljub večkratnim ponovitvam testov na sevu *S. pneumoniae*, nam za nekatere spojine, zaradi težav z rastjo MO, vrednosti MIC ni uspelo ugotoviti, tako da smo nekaj spojin za to kulturo izpustili. Sicer je metoda MIC je enostavna za odčitavanje, občutljiva, hitra, robustna ter zanesljiva in jo lahko uspešno uporabimo za ugotavljanje protimikrobnega delovanja spojin.

Večini testiranim spojinam smo ugotovili MIC vrednosti in tako potrdili, da jih nekaj izkazuje izrazitejše protimikrobno delovanje. Spojina 13, ki na osnovni cianotiofenski skelet pripet gvanidinski substituent, ima največje protibakterijsko delovanje, predvidoma zaradi tvorbe dodatnih ionskih in vodikovih vezi, ki

pomembno vplivajo na afiniteto vezave spojine v aktivno mesto encima in s tem posledično tudi na močnejše protimikrobno delovanje.

## 7. LITERATURA

1. Marie B. Coyle - Coordinator Editor. (2005), *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology, str. 53, 54 (MIC testing)
2. Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH (2003), *Susceptibility Test Methods: General Considerations*. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenover, R Tenover. Manual of Clinical Microbiology. 8th Ed. Washington. American Society of Clinical Microbiology, 1103
3. Rene S. Hendriksen (DFVF), *MIC determination by broth dilution using Sensititre.*, Global Salm-Surv (A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization, Laboratory Protocols, Level 1 Training Course, 4th Ed. April 2003, Modified version, november 2010, str. 2, 3
4. Antimicrobials that inhibit protein synthesis:  
<http://www.studyblue.com/notes/note/n/antimicrobials-that-inhibit-protein-synthesis/deck/3924876> (datum dostopa: 6.1.2014)
5. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. *Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals*. School of Biomedical Sciences, University of Ulster, 2007 Aug; 42(4):321-4.
6. Resazurin: <http://en.wikipedia.org/wiki/Resazurin> (datum dostopa: 6.1.2014)
7. Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto: Oddelek mikrobiologije, (navodilo za delo), *Mikrobiološka preiskava kužnin, ravnanje z vzorci*. 2008
8. Gubina, M, Ihan, A. (2002). *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, UNI LJ, 2002: str. 9, 10, 26, 41-46, 427-429, 440-441,
9. doc. dr. Marko Anderluh: *Strukturne značilnosti spojin s protibakterijskim delovanjem*, ppt predavanje z dne 23.10.2010: str. 16-30
10. Owens, J. (2007), *"Determining druggability"*. *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (3): str. 187–187
11. *"Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)"*. Hershey Medical Center, USA, Appelbaum PC (November 2007). *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 (5): str. 398–408

12. Graham, L. P., *An introduction to Medicinal Chemistry*, 4<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford, 2009; str. 423-425
13. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Pearson Studium, *Brock Mikrobiologie*, 2009; ISBN 978-3-8273-7358-8; str.83
14. Bouhss, A Trunkfield, A. E.; Bugg, T. D. H. Mengin-Lecreulx, D; *The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates; FEMS Microbiology reviews*, **2008**, 32 (2), 208-233
15. Vollmer, W.; Bertsche U. *Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli. Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1778 (9), 1714-1734
16. Mohammadi, T.; van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Vernet, T.; Zapun, A.; Bouhss, A.; Diepeveen-de Bruin, M.; Nguyen-Disteche, M.; de Kruijff, B.; Breukink, E.
17. Van Heijenoort, J. *Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology*, **2011**, 11(3),25R-36R; iz povzetka članka, 25R
18. [http://en.wikipedia.org/wiki/Penicillin\\_binding\\_proteins](http://en.wikipedia.org/wiki/Penicillin_binding_proteins) (datum dostopa 7.8.2013)
19. 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
20. Longenecker, K. L.; Stamper, G. F.; Hajduk, P. J.; Fry, E. H.; Jakob, C. G.; Harlan, J. E.; Edalji, R.; Bartley, D. M.; Walter, K. A.; Solomon, L. R.; Holzman, T. F.; Gu, Y. G.; Lerner, C. G.; Beutel, B. A., Stoll, V. S. *Structure of MurF from Streptococcus pneumoniae co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure...*, *Protein Science*, **2005**, 14 (12), abstract, 3039
21. C.A. Smith, *Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases*, *J. Mol. Biol.* 362 (2006) 640–655.
22. Yan, Y.; Munshi, S.; Leiting, B.; Anderson, M. S.; Chrzas, J.; Chen, Z. *Crystal structure of Escherichia coli UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution. Journal of molecular biology*, **2000**, 304 (3), 435-445
23. Hrast M, Turk S, Sosic I, Knez D, Randall CP, Barreteau H, Contreras-Martel C, Dessen A, O'Neill AJ, Mengin-Lecreulx D, Blanot D, Gobec S. *Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan*

- biosynthesis enzyme MurF*. Eur J Med Chem. 2013 Aug;66:32-45. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.05.013. Epub 2013 May 21.
24. Miller, D. J.; Hammond, S. M.; Anderluzzi, D.; Bugg, T. D. H *Aminoalkylphosphinate inhibitors of D-Ala-D-Ala adding enzyme.. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1998**, 131-142
25. Longenecker, K. L.; Stamper, G. F.; Hajduk, P. J.; Fry, E. H.; Jakob, C. G.; Harlan, J. E.; Edalji, R.; Bartley, D. M.; Walter, K. A.; Solomon, L. R.; Holzman, T. F.; Gu, Y. G.; Lerner, C. G.; Beutel, B. A., Stoll, V. S. *Structure of MurF from Streptococcus pneumoniae co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. Protein Science*, **2005**, 14 (12), 3039-3047
26. Turk, S.; Kovač, A.; Boniface, A.; Bostock, J. M.; Chopra, I.; Blanot, D.; Gobec, S. *Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening. Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 1884-1889
27. Baum, E. Z.; Crespo-Carbone, S. M.; Abbanat, D.; Foleno, B.; Maden, A.; Goldschmidt, R.; Bush, K *Utility of muropeptide ligase for identification of inhibitors of the cell wall biosynthesis enzyme MurF.. Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2006**, 50 (1), 230-236
28. Baum, E. Z.; Crespo-Carbone, S. M.; Klinger, A.; Foleno, B. D.; Turchi, I.; Macielag, M.; Bush, K. A. *MurF Inhibitor That Disrupts Cell Wall Biosynthesis in Escherichia coli. Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2007**, 51 (12), 4420-4426
29. Baum, E. Z.; Crespo-Carbone, S. M.; Foleno, B. D.; Simon, L. D.; Guillemont, J.; Macielag, M.; Bush, K. *MurF Inhibitors with Antibacterial Activity: Effect on Muropeptide Levels. Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2009**, 53 (8), 3240-3247
30. Hrast, M.; Anderluh, M.; Knez, D., Randall, C. P.; Barreteau, H.; O'Neill, A. J.; Blanot, D.; Gobec, S.: *Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on cyanothiophene scaffold: European Journal of Medicinal Chemistry* 73, **2014**, 83-96
31. Cavalieri, S. J ... [et al]. *Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement*; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M100-17, Vol 27 No.1, January 2007