

**Dražen Lež**

**Antimikrobni učinak željezovih i galijevih  
kompleksa aroilhidrazona u *in vitro* uvjetima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ivana Kosalca.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Ivanu Kosalcu na pomoći u izboru teme diplomskog rada te svim savjetima i korekcijama tijekom provedbe istraživanja i pisanja rada. Također zahvaljujem svom osoblju Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, posebno tehničkoj suradnici Štefici Babić, kao i dr. sc. Josipi Vlanić s Instituta Ruđer Bošković na iskazanoj susretljivosti i pomoći tijekom izvođenja eksperimenata.

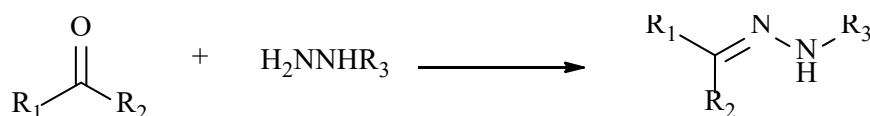
## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hidrazoni .....	1
1.2. Aroilhidrazoni.....	2
1.3. Željezo .....	6
1.4. Galij .....	14
1.5. Antimikrobni učinci galija.....	16
1.6. Kompleksi galija i hidrazona.....	19
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>22</b>
3.1. Vrste mikroorganizama .....	22
3.2. Hranjive podloge .....	22
3.3. Otapala i drugi materijal .....	22
3.4. Fe i Ga kompleksi aroilhidrazona.....	23
3.5. Galijev(III) nitrat .....	24
3.6. Antimikrobni lijekovi .....	24
3.7. Uzgoj mikroorganizama .....	24
3.8. Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti metodom difuzije u agaru („agar-well diffusion“) .....	24
3.9. Određivanje antimikrobnog učinka metodom mikrodilucije.....	26
3.10. Određivanje kinetike stanične smrti vrste <i>C. albicans</i> („time-kill“ metoda) .....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>32</b>
4.1. Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem metodom difuzije u agaru .....	32
4.2. Određivanje antimikrobnog učinka kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem metodom mikrodilucije.....	35
4.3. Ispitivanje antimikrobnog učinka u vremenu spoja 6 na <i>C. albicans</i> ATCC 10231 i <i>C.</i> <i>albicans</i> <sup>FLR+</sup> MFBF 11100 korištenjem „time-kill“ metode.....	40
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>48</b>
<b>7. SAŽETAK / SUMMARY</b> .....	<b>63</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

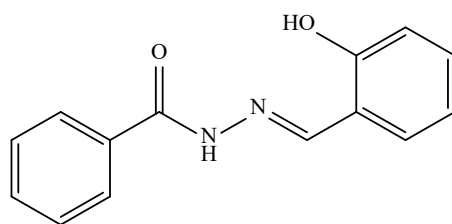
## 1.1. Hidrazoni

Hidrazoni su skupina organskih spojeva opće strukturne formule  $R_1R_2C = NNR_3R_4$ . Nastaju kondenzacijom aldehida ili ketona s derivatima hidrazina (slika 1), prilikom čega dolazi do zamjene karbonilnog kisika s  $-NNH_2$  funkcionalnom skupinom (Dayagi i Degani, 1970).



**Slika 1.** Reakcija sinteze hidrazona

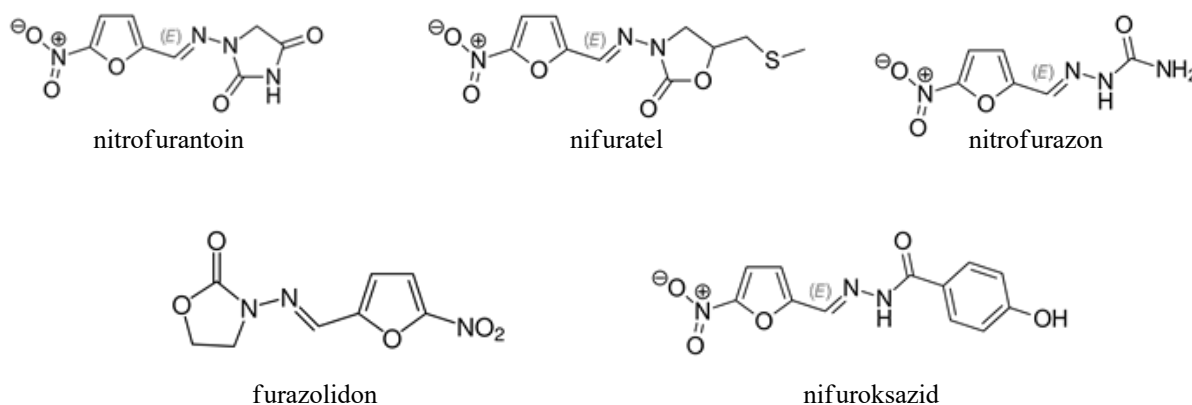
Zbog jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava i široke primjene intenzivno se proučavaju čitav niz godina. Mnogi aril- ( $Ar-NH-N=CH-R$ ;  $R =$  alkil ili aril) i aroil- ( $Ar-CO-NH-N=CH-R$ ;  $R =$  alkil ili aril) hidrazoni biološki su aktivni, pokazuju antibakterijsku, antifungalnu, antituberkuloznu, antivirusnu, antimalarijsku i antitumorsku aktivnost (Verma i sur., 2014). Hidrazoni su se pokazali kao vrlo dobri ligandi koji tvore stabilne komplekse s većinom prijelaznih metala, pri čemu reagiraju kao tridentatni ligandi. Značajniji interes za moguću primjenu hidrazona kao kelatora u medicinskoj kemiji počeo se javljati oko 1982., kada je pokazano da salicilaldehid benzoilhidrazon (slika 2) može služiti kao lijek kod povećanih razina željeza u krvi. Naime, kompleks koji nastaje reakcijom ovog hidrazona s ionima željeza je vrlo stabilan na čemu se temelji klinički tretman liječenja hemokromatoze, odnosno povišenih koncentracija željeza u krvi (Ainscough i sur., 1999).



**Slika 2.** Salicilaldehid benzoilhidrazon

## 1.2. Aroilhidrazoni

Derivati hidrazona koji sadrže azometinsku skupinu (-NHN=CH-) povezanu s karbonilnom skupinom nazivaju se aroilhidrazoni. Okosnica koju čine te dvije skupine uglavnom je odgovorna za biološke učinke ovih spojeva. Aroilhidrazonska struktura prisutna je u mnogim biološki aktivnim molekulama koje uključuju antibakterijsku, antituberkuloznu, antifungalnu, antitumorsku, protuupalnu, antikonvulzivnu, antivirusnu i antiprotozalnu aktivnost. Od navedenih svojstava, antimikrobna aktivnost najčešće je opisana u znanstvenoj literaturi. Štoviše, neki poznati i dugo korišteni antimikrobni lijekovi po strukturi su aroilhidrazoni, i to: nitrofurantoin, nifuratel, nitrofurazon, furazolidon i nifuroksazid (slika 3) (Popiołek, 2010). Redukcijom aroilhidrazona također nastaju biološki aktivni spojevi poput iproniazida (antituberkulotik i antidepresiv) (Rollas i Küçükgül, 2007).



**Slika 3.** Primjeri aroilhidrazona kao antimikrobnih lijekova

Metabolizam aroilhidrazona proučavan je *in vitro* i *in vivo*. U *in vitro* studijama na mikrosomalnim hepatocitima nađeno je da aroilhidrazoni podliježu reakcijama hidrolize azometinske skupine te aromatskim hidroksilacijama na aromatskim prstenovima (Ülgen i sur., 1997; Kömürcü i sur., 1995). Daljnje farmakokinetičke studije potvrdile su relativno kratko vrijeme poluraspada triju različitih aroilhidrazona kao posljedicu hidrolize hidrazonske veze u životinjskoj plazmi (Kovarikova i sur., 2008). Od novijih spojeva aroilhidrazona čija se biološka aktivnost ispituje, posebno su zanimljivi derivati salicilaldehida, *o*-vanilina i hidrazida nikotinske kiseline. Prema istraživanju Galić i sur., navedeni spojevi pokazali su se stabilnima pri različitim omjerima smjese DMSO i vode u kojoj su bili otopljeni (Galić i sur., 2012), međutim, njihova stabilnost u plazmi nije ispitana.

Najviše derivata aroilhidrazona ispitano je na antibakterijsku aktivnost. Prema jednom istraživanju, od više aroilhidrazona izvedenih iz hidrazida izonikotinske kiseline, [3-(2-feniltiazol-4-il-metoksi)-benziliden]-hidrazid pokazao je najbolju antibakterijsku aktivnost (ZOI = 15 mm) u usporedbi s ampicilinom (ZOI = 16 mm) na bakteriji *Staphylococcus aureus*. Isti spoj također je bio aktivan (ZOI = 12 – 17 mm) i prema ostalim ispitanim bakterijama (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Proteus mirabilis* i *Salmonella enteritica*) u usporedbi s korištenim kontrolama (ampicilin, ciprofloksacin, gentamicin i kotrimoksazol) (Moldovan i sur., 2011). Trinaest novosintetiziranih aroilhidrazona izvedenih iz salicilaldehida i hidrazida nikotinske kiseline ispitano je posjeduju li antimikrobni učinak na referentne i klinički rezistentne sojeve *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*. Najbolji učinak utvrđen je za *N'*-(2-hidroksi-5-nitrofenilmetiliden)-3-piridinkarbohidrazid (MIK iznosi 0,12 µmol/mL za referentni *S. aureus* soj, 0,02 µmol/mL za MRSA soj, 0,36 µmol/mL za ESBL+ *E. coli* soj) koji je osim antibakterijskog pokazao i antibiofilmski učinak na ispitani soj ESBL+ *E. coli* u molarnoj koncentraciji nižoj od gentamicina (Polović i sur., 2019). Antibakterijska aktivnost hidrazonskih derivata vanilina ispitana je disk-difuzijskom metodom na *Pseudomonas aeruginosa* i *S. aureus* bakterijske sojeve. Nekoliko spojeva pokazalo je umjerenu antibakterijsku aktivnost (ZOI = 3 – 8 mm) u usporedbi s ciprofloksacinom (ZOI = 9 – 12 mm) pri jednakim koncentracijama (200 µg/mL) (Govindasami i sur., 2011).

Sljedeće često ispitivano svojstvo aroilhidrazona učinak je na mikobakterije, posebice na *Mycobacterium tuberculosis*. Od 23 različita derivata hidrazida izonikotinske kiseline, njih čak trinaest pokazalo je dobru antituberkuloznu aktivnost prema jednom izoniazid-osjetljivom i trima izoniazid-rezistentnim kliničkim izolatima *M. tuberculosis*. Štoviše, *N'*-(2-metoksibenziliden)-izonikotinoilhidrazid pokazao je bolju aktivnost od izoniazida prema izoniazid-osjetljivom soju, a MIK je iznosio 0,98 µg/mL (Coelho i sur., 2012).

Antifungalna aktivnost aroilhidrazona također je primijećena u nekoliko studija. U jednoj od njih, četiri derivata *N'*-(2-hidroksibenziliden)-benzohidrazida pokazali su snažnu aktivnost prema ispitivanim sojevima *Candida albicans* (MIK<sub>80</sub> = 0,5 – 4 µg/mL) i *Candida glabrata* (MIK<sub>80</sub> = 0,5 – 1 µg/mL). Derivati *N'*-(2-hidroksibenziliden)-4-nitrobenzohidrazida još su jače inhibirali navedene sojeve Candide. Dva najaktivnija spoja (*N'*-(2-hidroksibenziliden)-4-nitrobenzohidrazid i *N'*-(2-hidroksi-5-metilbenziliden)-4-nitrobenzohidrazid) imala su MIK<sub>80</sub> = 0,5 µg/mL prema *C. albicans* i MIK<sub>80</sub> = 0,125 – 0,5 µg/mL prema *C. glabrata* (Backes i sur., 2014). U već spomenutom istraživanju autora

Polović i sur., *N'*-(2-hidroksi-5-metoksifenilmetiliden)-3-piridinkarbohidrazid inhibirao je porast referentnog i klinički rezistentnog soja *C. albicans* uz IC<sub>90</sub> vrijednosti od 0,18 μmol/mL, odnosno 0,10 μmol/mL (Polović i sur., 2019).

Aroilhidrazoni su našli svoje mjesto i u ispitivanjima potencijalnih antimalarika. Prema jednom istraživanju, 2-hidroksi-1-naftilaldehid izonikotinoil hidrazon i 2-hidroksi-1-naftilaldehid-4-fenil-3-tiosemikarbazon pokazali su jaču antimalarijsku aktivnost od desferoksamina protiv klorokin-osjetljivih i klorokin-rezistentnih parazita *Plasmodium falciparum* u *in vitro* uvjetima (Walcourt i sur., 2004). U daljnjim istraživanjima otkriveno je da navedeni spojevi ne oštećuju membranu eritrocita, djeluju na sve stadije razvoja *P. falciparum* unutar eritrocita te da njihova aktivnost vjerojatno potječe od kompleksacije i ograničavanja raspoloživosti željeza potrebnog za razvoj *P. falciparum* (Walcourt i sur., 2013).

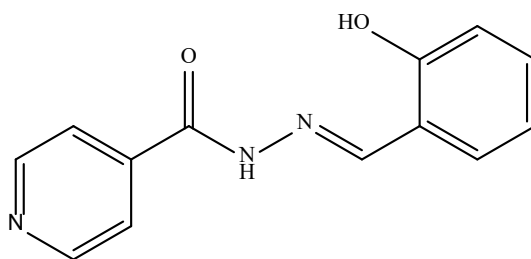
Antivirusna aktivnost hidrazona i njihovih derivata najslabije je proučavana od svih njihovih poznatih bioloških djelovanja. Tek u jednom istraživanju potvrđen je učinak nekoliko analoga *N*-arilaminoacetilhidrazona na *Herpes simplex* virus tip 1 i hepatitis A virus. U testu redukcije broja virusnog plaka, sveukupno pet spojeva pokazalo je aktivnost usporedivu ili veću od amantadina prema hepatitis A virusu, dok je deset spojeva pokazalo umjerenu aktivnost prema *Herpes simplex* virusu tip 1, ali slabiju od aciklovira (Abdel-Aal i sur., 2006).

U širokom spektru bioloških aktivnosti aroilhidrazona, značajno mjesto zauzima antiproliferativni učinak. Potentni i selektivni učinak inhibicije sinteze DNA u tumorskim staničnim linijama zabilježen je kod aroilhidrazona nastalih kondenzacijom salicilaldehida i različitih hidrazida te njihovih bakrovih(II) kompleksa, a poznat je već puno godina (Johnson i sur., 1982). U jednom novijem istraživanju, 17 različitih aroilhidrazona, derivata hidrazida nikotinske i izonikotinske kiseline, ispitano je posjeduju li antiproliferativni učinak na tumorskim i netumorskim staničnim linijama. Četiri spoja, koji su imali dvije hidroksilne ili jednu hidroksilnu i jednu nitro skupinu na pozicijama 2 i 5 na benzenskom prstenu, pokazali su najbolji i najselektivniji učinak na tumorske stanične linije (Iliev i sur., 2019). Tri nova derivata salicilaldehid benzoilhidrazona također su inhibirala rast više staničnih linija humanih karcinoma u mikromolarnim koncentracijama, a 3-metoksisalicilaldehid izonikotinoilhidrazon pokazao je usporedivo i/ili bolje djelovanje od cisplatina i melfalana (Nikolova-Mladenova i sur., 2011). I drugi analozi aroilhidrazona, poput benzoizotiazol

hidrazona, pokazali su antitumorski učinak prema hematološkim novotvorinama pri čemu je najaktivniji bio spoj sa hidroksilnom skupinom na položaju 2 benzenskog prstena ( $IC_{50} = 0,5 - 8,0 \mu M$ ), a djelovao je jednako potentno kao i 6-merkaptopurin (Vicini i sur., 2006).

Antikonvulzivna aktivnost zabilježena je kod derivata melatonina koji su ujedno sadržavali i aroilhidrazonski dio u svojoj strukturi. U *in vivo* studiji na miševima, tri derivata melatonina i aroilhidrazona (primijenjeni intraperitonealno) povisili su prag za miokloničke grčeve te kloničke i toničke napadaje uzrokovane iv infuzijom feniltetrazola pri čemu im je učinak bio usporediv s karbamazepinom i melatoninom. Istom studijom utvrđeno je da antikonvulzivna aktivnost vjerojatno potječe od djelovanja spojeva na  $MT_1$  receptore (Tchekalarova i sur., 2019).

Oksidativni stres značajan je faktor u patofiziologiji mnogih bolesti, uključujući kardiovaskularne. Slobodni unutarstanični ioni željeza sudjeluju u Fentonovoj reakciji i pridonose nastajanju hidroksilnih radikala – najreaktivnijih i najtoksičnijih ROS-a te oštećenju membrana, proteina i DNA. Pacijenti koji boluju od bolesti preopterećenja željezom („iron overload disease“) posebno su izloženi štetnim učincima viška Fe iona u organizmu (Halliwell i Gutteridge, 2007; Kalinowski i Richardson, 2005). U istraživanjima takvih stanja, hidrazoni i njihovi derivati prepoznati su kao potencijalni terapeutici zbog svoje sposobnosti kelacije željeza. Salicilaldehid izonikotinoil hidrazon (SIH) tridentatni je kelator željeza koji dobro prodire kroz stanične membrane i čvrsto veže labilne Fe ione (slika 4).



**Slika 4.** Salicilaldehid izonikotinoil hidrazon

Dokazano je njegovo citoprotektivno i kardioprotektivno djelovanje u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. U više istraživanja, SIH je zaštitio stanične linije kardiomiocita i kardiomioblasta od oksidativnog oštećenja (Simunek i sur., 2005; Horackova i sur., 2000) te je pokazao bolji omjer citoprotektivne aktivnosti i toksičnosti u odnosu na druge poznate kelatore željeza, uključujući desferoksamin (Bendova i sur., 2010). U *in vivo* studiji, SIH je u dozi od 1,0 mg/kg primijenjen intravenski uspio u potpunosti spriječiti smrt zečeva u modelu



daunorubicinom-inducirane kardiomiopatije (Sterba i sur., 2007). Kao glavno ograničenje primjene SIH-a u navedenim istraživanjima pokazala se brza degradacija u biološkim sustavima i kratko vrijeme poluraspada. U tu svrhu, sintetizirani su novi derivati SIH-a s povećanom stabilnosti u staničnom mediju i plazmi te boljim citoprotektivnim učinkom (Jansova i sur., 2018; Hruskova i sur., 2011).

### 1.3. Željezo

Jedan od esencijalnih mikronutrijenata neophodnih za rast i razvoj životinja i biljaka, ali i mikroorganizama jest željezo (Fe) (Coughlan, 1971). Za čovjeka, željezo je ključna funkcionalna komponenta globularnih proteina prijenosnika kisika (npr. hemoglobina i mioglobina), citokroma i ostalih enzima koji prenose elektrone. Iako je sveprisutno u okolišu, Fe(III) teško je topljivo u vodenim otopinama pri fiziološkom pH. Iz tog razloga većini je organizama pravi izazov kako osigurati adekvatne količine željeza za kritične biološke procese, a istovremeno izbjeci toksičnost povezanu sa slobodnim željezovim ionima. Sisavci većinu željeza unose hranom. Anorgansko, nehemsko željezo slabo se apsorbira, dok se organsko (hemsko) željezo apsorbira u puno većoj mjeri, uglavnom u obliku hemoglobina ili mioglobina iz životinjskih izvora. Glavnina apsorpcije odvija se u duodenumu preko transmembranskih transportera pri čemu se apsorbirano željezo brzo veže za transferin, plazmatski protein koji visokim afinitetom veže željezo. Gotovo svo serumsko željezo vezano je za transferin, a tek male količine vezane su za albumin i druge proteine. Većina unutarstaničnog željeza, ali i ukupnog željeza u organizmu, nalazi se u sastavu hemoglobina u eritrocitima. Višak željeza dominantno se skladišti u hepatocitima gdje je vezano za feritin te je u tom obliku dobro topljivo, netoksično i spremno za mobilizaciju kad zatreba drugdje u organizmu (Andrews i Schmidt, 2007). Glavni regulator homeostaze željeza jest peptidni hormon hepcidin (Nicolas i sur., 2004). On djeluje kao negativni regulator – pri visokim koncentracijama hepcidina (npr. kod upale, infekcije, pojačane aktivnosti eritropoetina itd.) inhibirana je apsorpcija željeza iz probavnog sustava kao i otpuštanje željeza iz makrofaga koji recikliraju stare eritrocite. S druge strane, pri niskim koncentracijama hepcidina (npr. kod anemije) potiče se apsorpcija željeza i otpuštanje iz makrofaga preko transportnog proteina ferroportina (Nemeth i sur., 2004). Toksičnost željeza uglavnom je povezana sa stvaranjem reaktivnih kisikovih specija (ROS). Nusprodukti aerobnog metabolizma, vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i superoksidni anion ( $O_2^-$ ) u prisutnosti željezovih iona ( $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ ) Fentonovom reakcijom daju hidroksilni radikal ( $OH^\bullet$ ), najtoksičniji ROS koji može oštetiti bilo koju makromolekulu. No u većini slučajeva aerobni organizmi zaštićeni su od nastanka

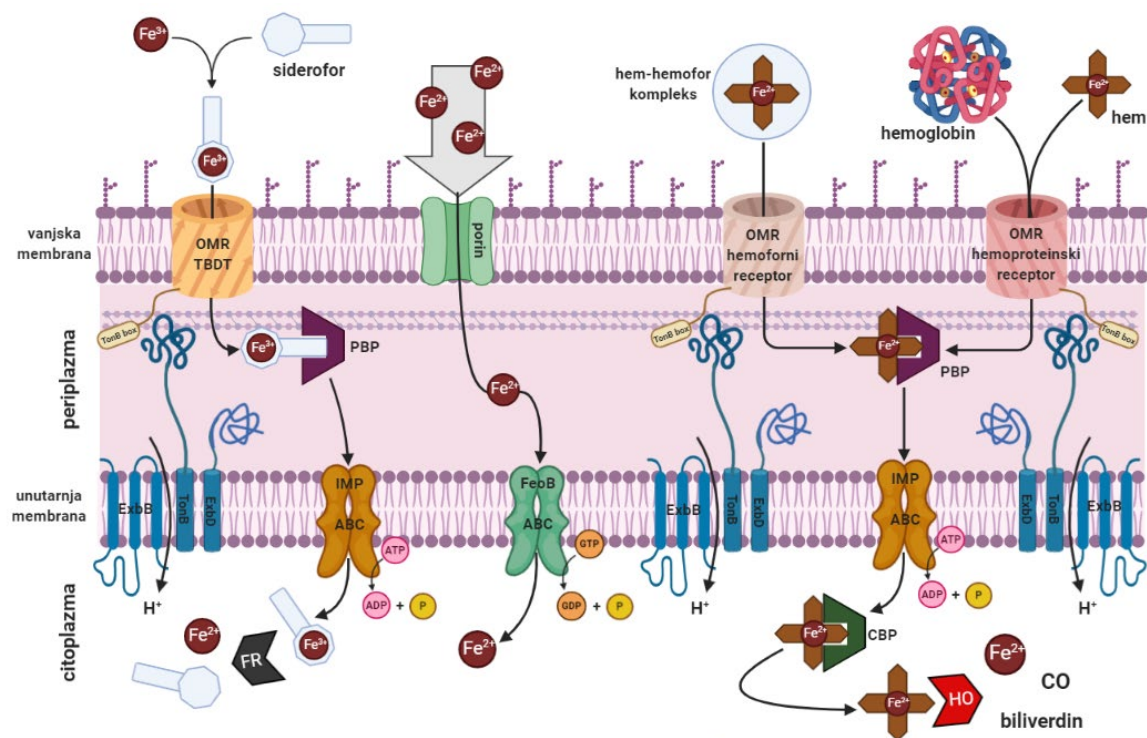
hidroksilnog radikala zbog prisutnosti enzima superoksid dismutaze (SOD) i katalaze koji razgrađuju reaktante potrebne za odvijanje Fentonove reakcije (Riedel i sur., 2019).

Željezo je element koji ima brojne funkcije i u stanicama mikroorganizama. Najveća važnost željeza leži u njegovom oksidoredukcijskom potencijalu. U reakcijama oksidacije i redukcije, željezo prelazi iz fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oksidacijskog stanja u feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) oksidacijsko stanje i obrnuto te na taj način donira, tj. prima elektrone i katalizira brojne reakcije (Andrews i sur., 2013). Poglavitito kod bakterija, dokazano je da željezo utječe na: rast, sintezu DNA i RNA, promjene u morfologiji stanica, metabolizam (oksidativna fosforilacija, fiksacija dušika, različite biosinteze), nastajanje metaboličkih produkata (sintezu toksina, vitamina, antibiotika, pigmenata, citokroma...) te pravilno funkcioniranje enzima (npr. peroksidaze, SOD, nitrogenaze, hidrogenaze, glutamat sintaze...) (Messenger i Barclay, 1983). Jedan od najboljih primjera važnosti željeza za metabolizam mikroorganizama odnosi se na proizvodnju sekundarnih metabolita – antibiotika i toksina. Dodatkom željeza u hranjivi medij u većim koncentracijama nego što je potrebno za optimalni rast, povećana je proizvodnja kloramfenikola kod *Streptomyces venezuelae*, streptomicina kod *Streptomyces griseus* i penicilina kod *Penicillium chrysogenum*. Također, veće koncentracije željeza u hranjivom mediju dovele su do pojačane produkcije tetanospazmina kod *Clostridium tetani*, neurotoksina kod *Shigella dysenteriae* te enterotoksina kod *Staphylococcus aureus* (Weinberg, 1969).

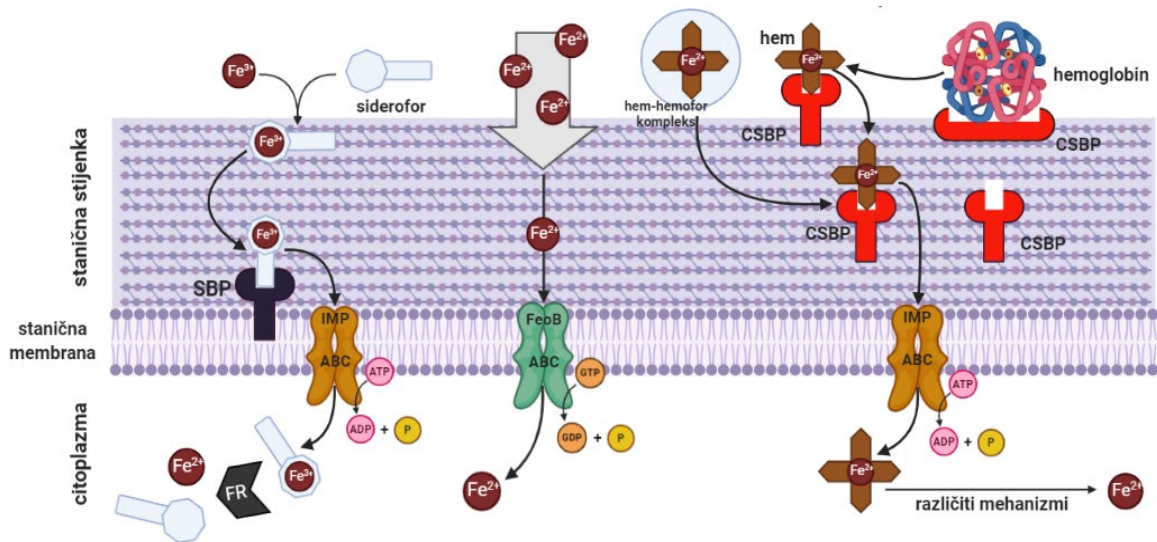
Zbog velike važnosti željeza za rast i razvoj mikroorganizama, domaćinski organizmi (poglavitito sisavci) razvili su jednostavan i nespecifični oblik imuniteta koji ograničava raspoloživost željeza, a zove se „nutritivni imunitet“ (Kochan, 1973). Kao što mu ime govori, nutritivni se imunitet temelji na ograničavanju dostupnosti nekog esencijalnog nutrijenta i na taj način usporava razvoj patogena. Istovremeno, nutritivni imunitet osigurava dodatno vrijeme za aktivaciju ostalih obrambenih mehanizama, poglavitito stanične imunosti (Messenger i sur., 1983). Čak i kad organizam nije u stanju infekcije, pohrana željeza unutar hemoglobina, kao i vezanje serumskog željeza za transferin stvaraju uvjete u kojima je koncentracija slobodnog željeza niska. Glavnu ulogu u uvođenju organizma u stanje niske bioraspoloživosti slobodnog željeza, tzv. hipoferemije, ima hepcidin (Cassat i Skaar, 2013; Nemeth i sur., 2004). Proinflamatorni citokini i aktivacija Toll-like receptora potiču otpuštanje hepcidina iz jetre (Drakesmith i Prentice, 2012). Dodatno, hepcidin sintetiziraju i neutrofili i makrofagi te tako aktiviraju nutritivni imunitet na mjestu infekcije (Peyssonnaud i sur., 2006). Hepcidin zatim internalizira i degradira feroportin – transporter koji izbacuje

željezo kroz bazolateralnu membranu (dominantno enterocita i makrofaga) u izvanstaničnu tekućinu (Abboud i Haile, 2000). Kao rezultat svega navedenog, ekstracelularna tekućina postaje siromašna slobodnim željezom i nepogodna za razvoj patogena. Osim dominantnog mehanizma preko hepcidina, nutritivni imunitet uključuje i aktivaciju o hepcidinu neovisnih mehanizama hipoferemije preko interferona  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleukina 1 i 6 (Nairz i sur., 2010; Weiss, 2005), ali i lokalno povećanje sekrecije laktoferina (glikoproteina koji veže željezo) na mukoznim membranama i degranulaciju neutrofila koji sadrže laktoferin (Masson i sur., 1969).

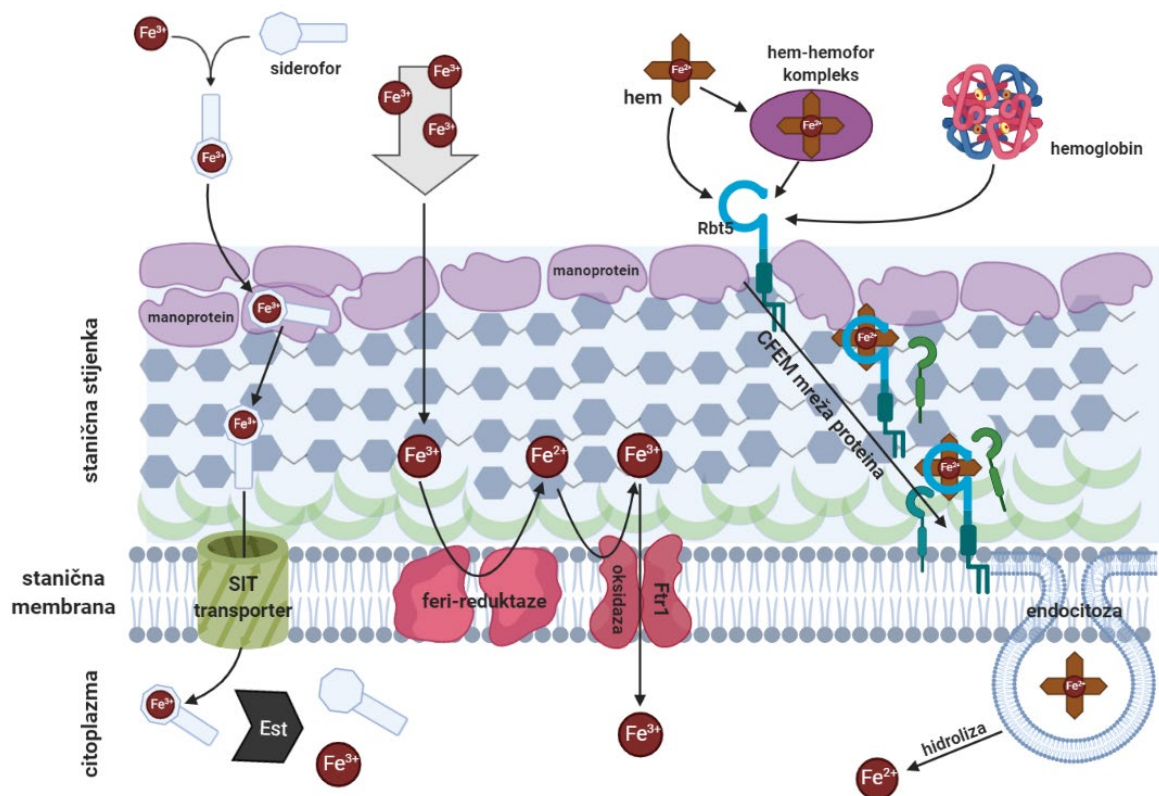
Niske razine slobodnog željeza u organizmu domaćina natjerale su mikroorganizme da razviju mehanizme „krađe“ željeza kako bi preživjeli u nepovoljnim uvjetima. Postoje tri glavna načina na koje bakterije, ali i gljivice iskorištavaju željezo od svojih domaćina: 1) unos željeza preko siderofora, 2) unos željeza preko  $\text{Fe}^{2+}$  iona, 3) iskorištavanje hema (Ballouche i sur., 2009). Na slikama 5, 6 i 7 pojednostavljeno su prikazani načini iskorištavanja željeza kod Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija te gljivica.



**Slika 5.** Načini iskorištavanja željeza kod Gram-negativnih bakterija, autorski rad, izrađeno pomoću <https://app.biorender.com/>



**Slika 6.** Načini iskorištavanja željeza kod Gram-pozitivnih bakterija, autorski rad, izrađeno pomoću <https://app.biorender.com/>



**Slika 7.** Načini iskorištavanja željeza kod gljivica, autorski rad, izrađeno pomoću <https://app.biorender.com/>

Siderofori predstavljaju male organske molekule ( $M_r < 1\text{kDa}$ ) koje su visokoafinitetni kelatori željeza. Mnogi prokarioti proizvode strukturno i funkcionalno različite siderofore u uvjetima smanjene bioraspoloživosti slobodnog željeza pri čemu svi stvaraju stabilne komplekse s  $\text{Fe}^{3+}$  ionima (Messenger i sur., 1983). S obzirom na strukturu dijela molekule koji kelira  $\text{Fe}^{3+}$ , tri su najčešća tipa siderofora: hidroksamati (npr. desferioksamin B), katekolati/fenolati (aromatski siderofori, npr. enterobaktin) i karboksilati (npr. stafiloferin A). Mehanizam unosa željeza preko siderofora najbolje je opisan kod Gram-negativnih bakterija. Siderofori se natječu s ostalim kelatorima  $\text{Fe}^{3+}$  u organizmu domaćina (najviše s transferinom) i sa željezom stvaraju tzv. ferisideroforni kompleks koji postaje iskoristiv za bakterije. Unos ferisiderofora u bakteriju posredovan je vanjskim membranskim receptorima („Outer Membrane Receptors“, OMR) koji specifično prepoznaju i vežu ferisideroforni kompleks. Translokacijski sustav proteina (TonB) vezan za OMR (koji se također zove i TonB-ovisni transporter, TBDT) stvara elektrokemijski gradijent i omogućava ulaz ferisiderofora u periplazmatski prostor. Zatim se kompleks ferisiderofora veže za periplazmatski vežući protein („Periplasmatic Binding Protein“, PBP) i aktivno transportira preko citoplazmatske membrane. U tom procesu sudjeluje transmembranski kanal građen od unutarnjih membranskih proteina („Inner Membrane proteins“, IMP) i ABC transportera. Pri prijelazu u citoplazmu, ferisideroforni se kompleks odvaja od PBP-a. Završni korak predstavlja oslobađanje željeza od siderofora, a to se događa redukcijom  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  uz pomoć enzima željezo-reduktaze (FR) ili enzimatskom hidrolizom ferisiderofornog kompleksa (Miethke i sur., 2007). Unos siderofora kod Gram-pozitivnih bakterija jednostavniji je nego kod Gram-negativnih i uključuje protein koji veže siderofore („Siderophore Binding Protein“, SBP) te ABC transporter na citoplazmatskoj membrani (Sheldon i Heinrichs, 2015). Iskorištavanje ferisiderofora kao izvora željeza prisutno je i kod filamentoznih gljivica i kvasaca. Glavnu ulogu u tom procesu ima siderofor-željezo transporter („Siderophore iron transporter“, SIT) koji se nalazi na staničnoj membrani i jedinstven je za carstvo gljiva. SIT djeluje kao kotransporter koji koristi elektrokemijski gradijent za unos siderofora u citoplazmu, a ne ATP (Haas i sur., 2008). Neki kvasci, kao npr. *S. cerevisiae*, dodatno sadrže manoproteine u staničnoj stijenci koji vežu ferisiderofore i „vode“ ih do SIT transportera na staničnoj membrani (Protchenko i sur., 2001). Nakon ulaska u citoplazmu, esteraze (Est) hidroliziraju ferisideroforni kompleks i oslobađaju  $\text{Fe}^{3+}$  (Kragl i sur., 2007).

Zbog bolje topljivosti i iskoristivosti  $\text{Fe}^{2+}$  od  $\text{Fe}^{3+}$  iona, bakterije su razvile sustav unosa  $\text{Fe}^{2+}$  iona u stanicu koji je sličan i kod Gram-pozitivnih i kod Gram-negativnih

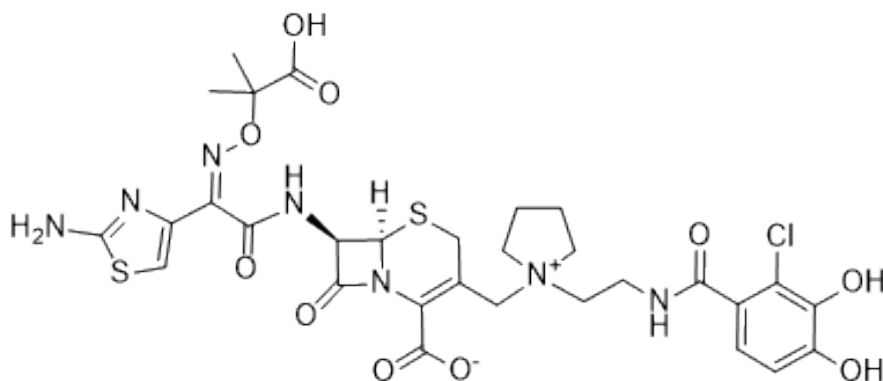
bakterija. Izvanstanični  $\text{Fe}^{2+}$  može ući u periplazmatski prostor Gram-negativnih bakterija preko porina, a zatim i u citoplazmu preko FeoB unutarnjeg membranskog proteina. FeoB je zapravo permeaza koja aktivnim transportom unosi  $\text{Fe}^{2+}$  u citoplazmu (Cartron i sur., 2006). Unos  $\text{Fe}^{2+}$  predstavlja glavni put unosa željeza kod gljivica. Feri-reduktaze na staničnoj membrani *S. cerevisiae* reduciraju  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  koji zatim ulazi u stanicu preko visokoafinitetnog transportnog kompleksa koji istovremeno reoksidira  $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$  i unosi ga u stanicu uz pomoć permeaze Ftr1 (Kosman, 2003).

S obzirom da se velika količina željeza u eukariotima nalazi pohranjena u hemoglobinu, iskorištavanje hema također je jedan od važnih izvora željeza za bakterije. Slično sideroforima, neke Gram-negativne bakterije proizvode hemofore, proteine koji vežu hem iz hemoproteina. Takvi kompleksi hemoproteina i hema prepoznati su od strane vanjskih membranskih receptora (npr. HasR kod *Serratia marcescens*) te ulaze prvo u periplazmatski prostor, a zatim i u citoplazmu na sličan način kao ferisideroforni kompleksi. Neke bakterije mogu i direktno iskorištavati hem i hemoglobin na način da ih prepoznaju specifičnim vanjskim membranskim receptorima (npr. PhuR kod *P. aeruginosa*) i unose u stanicu kao i hemofore. Kada uđe u citoplazmu, za bakterije toksičan hem veže se za citoplazmatski vežući protein („Cytoplasmic Binding Protein“; CBP) i prenosi do enzima hem-oksigenaze (HO) koji ga razgrađuje na biliverdin, ugljikov monoksid i  $\text{Fe}^{2+}$  (Tong i Guo, 2009). Kod Gram-positivnih bakterija iskorištavanje hema uključuje sustav proteina koji vežu hem i/ili hemoproteine u staničnoj stijenci („Cell-surface binding proteins“; CSBP) te ih prenose do ABC transporter na staničnoj membrani. Takvi sustavi proteina specifični su za pojedinu bakterijsku vrstu (Choby i Skaar, 2016). Iskorištavanje hema i hemoglobina kao izvora željeza moguće je i kod gljivica. *C. albicans* posjeduje skupinu srodnih proteina (tzv. CFEM mreža proteina), od kojih je najvažniji Rbt5, GPI-usidreni hemoglobinski receptor, koji omogućava endocitozu hemoglobina u citoplazmu i njegovu hidrolizu (Bairwa i sur., 2017).

Postojanje imunološkog odgovora koji cilja metabolizam željeza mikroorganizama kao i činjenica da je željezo esencijalan mikronutrijent za patogene mikroorganizme, doveli su do razvoja antimikrobnih strategija usmjerenih upravo na taj metabolički put. Tri su glavne strategija inhibicije metabolizma željeza: 1) strategija „trojanskog konja“, 2) upotreba kelatora ili antagonista željeza, 3) upotreba inhibitora pojedinih koraka u metabolizmu željeza (Ballouche i sur., 2009).



Koncept „trojanskog konja“ temelji se na tvarima koje patogenima izgledaju kao normalni izvori željeza koje mogu unijeti u stanicu, a zapravo posjeduju antimikrobnu aktivnost. Prvi takvi spojevi koji su otkriveni bili su sideromicini (Braun i sur., 2009). Sideromicini su po strukturi siderofori koji su kovalentno povezani s antimikrobnom tvari. Proizvode ih streptomicete i aktinomicete, a ulaze u bakteriju istim putem kao i siderofori. Primjeri sideromicina su: albomicin, ferimicin, danomicin, salmicin (Ballouche i sur., 2009). Albomicin u svojoj strukturi sadrži hidroksamatni dio koji kompleksira  $Fe^{3+}$  i kovalentno vezan nukleozidni analog tioribozil pirimidin (Turkova i sur., 1963). Zahvaljujući siderofornom dijelu, albomicin preko vanjskog membranskog receptora ulazi u bakteriju. Peptidaze u citoplazmi bakterije cijepaju peptidnu vezu između siderofora i tioribozil pirimidina koji zatim inhibira seril-tRNA sintetazu i djeluje bakteriostatski (Stefanska i sur., 2000). Iz razloga što bakterije aktivno unose albomicin u stanicu, utvrđene su vrlo niske minimalne inhibitorne koncentracije koje iznose 2 – 5 ng/mL za mnoge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, uključujući *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Salmonella enteritidis* (Pramanik i sur., 2007). Ostali sideromicini, poput salmicina i danomicina, sadrže hidroksamatni sideroforni dio i aminoglikozidni dio te su učinkoviti protiv Gram-pozitivnih bakterija (Vertesy i sur., 1995; Huber i sur., 1986). Dizajnirani su i sintetski konjugati siderofora i antibiotika, uglavnom sulfonamida i beta-laktama, s ciljem povećanja antimikrobne aktivnosti (Wittmann i sur., 2002; Roosenberg i sur., 2000). Posljednjih godina uloženi su veliki naponi farmaceutske industrije da iskoristi upravo koncept „trojanskog konja“ za razvoj novih antibiotika koji bi djelovali na „multi-drug“ rezistentne (MDR) sojeve Gram-negativnih bakterija. Postignut je i prvi veliki uspjeh na tom području – FDA je u studenom 2019., a EMA u travnju 2020. godine odobrila upotrebu prvog siderofornog antibiotika – cefiderokola (slika 8).



**Slika 8.** Struktura cefiderokola

Cefiderokol je cefalosporin, strukturno sličan ceftazidimu i cefepimu, ali uz jednu značajnu razliku. U postraničnom lancu cefiderokol sadrži kateholnu skupinu pomoću koje kompleksira željezo i sustavom unosa siderofora ulazi u periplazmatski prostor gdje se veže za PBP („Penicillin-binding protein“) i inhibira sintezu peptidoglikana. Pokazao je učinkovitost u liječenju infekcija karbapenem-rezistentnih i MDR Gram-negativnih bacila, uključujući *Acinetobacter baumannii* i *P. aeruginosa* (Zhanel i sur., 2019). Strategija trojanskog konja pokazala se odgovarajućim mehanizmom i za djelovanje metaloporfirina koji ne sadrže željezo. To su spojevi koji se sastoje od protoporfirina i iona metala, npr. galija, cinka ili mangana, a koriste put iskorištavanja hema kao ulazna vrata u stanicu mikroorganizma. U ovom slučaju, metaloporfirini koji ne sadrže željezo oponašaju hem i ulaze u periplazmu bakterije gdje inhibiraju enzime dišnog lanca i induciraju proizvodnju ROS-a, a najučinkovitiji se pokazao Ga-protoporfirin kompleks (Stojiljković i sur., 1999). Prednost je ovakvih spojeva učinkovitost prema rezistentnim patogenima te netoksičnost za eukariotske stanice, dok je ograničenje to što su neučinkoviti kod anaeroba i bakterija koje ne iskorištavaju hem kao izvor željeza (Ballouche i sur., 2009).

Drugi pristup u razvoju antimikrobne strategije koja cilja metabolizam željeza podrazumijeva upotrebu kelatora ili antagonista željeza. Za kelatore je poželjno da vežu slobodno željezo velikim afinitetom, ali i da ih mikroorganizmi ne mogu iskoristiti kao izvor željeza. Primjer takvog kelatora je konalbumin, glikoprotein iz kokošnjeg jajeta, koji, kad je dodan u hranjivi medij, značajno je smanjio stvaranje biofilma *P. aeruginosa* (Moreau-Marquis i sur., 2008). Sličan učinak uočen je i za EDTA, potentni kelator dvovalentnih kationa, koji je tisuću puta bolje inhibirao stvaranje biofilma *P. aeruginosa* od gentamicina (Banin i sur., 2006). Kelacija željeza također se smatra jednim od glavnih mehanizama kojim ciklopiroks olamin, poznati antimikotik, pokazuje antifungalni učinak (Niewerth i sur., 2003). Pod antagonistima željeza podrazumijevaju se metali koji se umjesto željeza mogu vezati za siderofore ili ciljne enzime te na taj način inhibirati o željezu ovisne metaboličke puteve. Najviše dokaza za takav učinak uočeno je kod galija (Ga) koji se ne može reducirati kao željezo pa ga to čini idealnim antagonistom u metabolizmu željeza (Chitambar i Narasimhan, 1991). Još jedan metal koji se natječe sa željezom za vezanje na siderofore je vanadij (V). Dokazano je da se vanadij snažno veže za siderofore piokelin i pioverdin te je dodatak 1 – 2 mM vanadil sulfata u hranjivi medij snažno inhibirao porast *P. aeruginosa* (Baysse i sur., 2000).



Inhibicija pojedinih koraka u metabolizmu željeza još je jedna od mogućih opcija za razvoj novih antimikrobnih spojeva. Istraživanja takvih inhibitora malobrojna su, a većinom se odnose na inhibiciju sinteze siderofora (Ferrerias i sur., 2005), blokadu regulatora gena za sintezu siderofora (Rodriguez i sur., 2003) i inhibiciju enzima hem-oksigenaze (Furci i sur., 2007). Enzim L-ornitin-N<sup>5</sup>-monooksigenaza ili SidA sudjeluje u biosintezi siderofora fungalne vrste *Aspergillus fumigatus*. U jednom istraživanju, „high-throughput screening“ testom pronađen je spoj, celastrol (prirodni kinon-metid), koji je nekompetitivni inhibitor SidA i u koncentraciji od 2 μM inhibira porast *A. fumigatus* na krvnom agaru (Del Campo i sur., 2016). Jedan od novijih pristupa inhibicije metabolizma željeza uključuje blokadu unosa Fe<sup>2+</sup> koji je glavni put iskorištavanja željeza domaćina kod patogenih gljivica. Monoklonsko protutijelo C7 dizajnirano je tako da veže i blokira Als3p, manoprotein stanične stijenke vrste *C. albicans*. Autori ovog istraživanja uspjeli su dokazati da vezanje monoklonskog protutijela na Als3p blokira put unosa Fe<sup>2+</sup> te se na taj način postiže fungicidni učinak (Brena i sur., 2011).

#### 1.4. Galij

Galij (Ga) je metal atomskog broja 31 u periodnom sustavu elemenata i prvi je put otkriven 1875. godine. Temperatura taljenja galija iznosi 29,78 °C te je zbog toga jedan od rijetkih metala koji se otapa držanjem u ruci (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Iako nema poznatih fizioloških funkcija u ljudskom tijelu, može stupati u interakcije s različitim staničnim procesima i proteinima te se zbog toga proučava već dugo vremena. Galij i njegovi spojevi pokazali su se korisnima u dijagnostici, ali i u terapiji malignih bolesti te poremećaja metabolizma kalcija. Osim navedenih, opisani su i imunosupresivni, protuupalni i antimikrobni učinci galija i njegovih derivata (Chitambar, 2010).

Galij kao metal dijeli mnoga kemijska svojstva sa željezom uključujući ionski radijus, elektronsku konfiguraciju, koordinacijsku kemiju i naboj. Oktaedralni ionski radijus Ga<sup>3+</sup> kationa iznosi 0.620 Å, a Fe<sup>3+</sup> kationa iznosi 0.645 Å (Bernstein, 1998). Zbog toga, biološki sustavi ne razlikuju Ga<sup>3+</sup> od Fe<sup>3+</sup> te se može reći kako galij „oponaša“ željezo. Iz istog razloga, galij cirkulira krvlju vezan za transferin, a to je dokazano intravenskim injiciranjem radioaktivnog <sup>67</sup>Ga u zečeve pri čemu se sav galij vezao za transferin (Vallabhajosula i sur., 1980). Daljnjim studijama utvrđeno je da se galij u koncentracijama do 50 μM u potpunosti veže za transferin, a iznad te koncentracije višak galija cirkulira u obliku galata (Ga[OH<sub>4</sub>]<sup>-</sup>) (Bernstein, 1998). Svojstvo koje Ga<sup>3+</sup> najviše razlikuje od Fe<sup>3+</sup> jest nemogućnost redukcije u

$\text{Ga}^{2+}$  pri fiziološkim uvjetima. Upravo iz razloga što se  $\text{Ga}^{3+}$  ne može reducirati kao  $\text{Fe}^{3+}$ , a ipak se veže za iste ciljne proteine, dolazi do disfunkcije enzima i proteina koji su ovisni o redoks ulozi željeza (Kelson i sur., 2013). Interferiranje galija s metabolizmom željeza glavni je uzrok većine njegovih bioloških učinaka (Chitambar, 2016).

Svojstvo radioaktivnog galija ( $^{67}\text{Ga}$  citrat) da se nakuplja u tumorskim stanicama poznato je već mnogo godina (Edwards i Hayes, 1969). Scintigrafija radioaktivnim galijem dugo se vremena koristila u dijagnostici malignih oboljenja, najviše Hodgkinovog i ne-Hodgkinovog limfoma kada je bilo potrebno otkriti ostatke malignih stanica ili ponovnu pojavu bolesti nakon kemoterapije ili radioterapije (King i sur., 1994). Nakupljanje  $^{67}\text{Ga}$  u stanici limfoma znak je metaboličke aktivnosti i prisutnosti vijabilne maligne stanice. U novije vrijeme,  $^{67}\text{Ga}$  scintigrafija zamjenjuje se pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) u dijagnostici limfoma (Chitambar, 2010).

U *in vivo* ispitivanju antineoplastične aktivnosti soli metala 13. skupine, galijev(III) nitrat ( $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ ) pokazao se najučinkovitijim i najmanje toksičnim u supresiji rasta supkutano implaniranih tumora (Hart i Adamson, 1971). Od tog trenutka počinje intenzivno istraživanje kako antitumorskog, tako i drugih učinaka galijevog nitrata. Više nezavisnih kliničkih studija dokazalo je učinkovitost  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  u liječenju ne-Hodgkinovog limfoma i karcinoma mokraćnog mjehura (Pro i sur., 2004; Weick i sur., 1983). U svim navedenim istraživanjima galijev je nitrat primijenjen kod pacijenata s relapsom primarne bolesti koji nisu odgovarali na konvencionalne protokole liječenja te je sveukupno 30-ak % oboljelih dobro reagiralo na liječenje. Također je primijećeno da galijev nitrat ne uzrokuje mijelosupresiju te se može koristiti kod pacijenata s leukopenijom i trombocitopenijom. U *in vitro* ispitivanjima dokazano je da se  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  veže za transferin u krvnoj plazmi i ulazi u maligne stanice endocitozom u obliku Ga-transferin kompleksa preko transferinskih receptora (Chitambar i Živković, 1987). Ako se uzme u obzir činjenica da su transferinski receptori visoko eksprimirani kod limfoma i na stanicama mokraćnog mjehura, jasno je zašto se  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  pokazao najučinkovitiji u liječenju upravo tih tumora (Smith i sur., 1990; Habeshaw i sur., 1983). U citoplazmi dolazi do odvajanja galija od transferina te interferiranja s unutarstaničnim metabolizmom željeza (Chitambar i Seligman, 1986). Dominantan mehanizam antineoplastičnog djelovanja galija očituje se u inhibiciji enzima ribonukleotid reduktaze. Galij ograničava dostupnost željeza potrebnog za aktivnost R2 podjedinice ribonukleotid reduktaze, ali i direktno inhibira navedeni enzim te se kao posljedica javlja inhibicija sinteze DNA (Narasimhan i sur., 1992). Također su opisani i dodatni mehanizmi

koji uključuju indukciju apoptoze te generiranje ROS-a. Zadnjih godina intenzivno se ispituje antineoplastični učinak i drugih spojeva s galijem koji uključuju galijev maltolat, tris(8-kinolonat)Ga(III), galijeve tiosemikarbazone te organometalne galijeve spojeve (Chitambar, 2010).

Tijekom istraživanja antineoplastičnih učinaka galijevog nitrata, primijećeno je da kod statistički značajnog broja pacijenata dolazi do smanjenja koncentracije kalcija u krvi (Warrell i sur., 1983). Na temelju tih zapažanja, provedena su randomizirana klinička ispitivanja u kojima se usporedio učinak  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  s bisfosfonatima kod onkoloških pacijenata s hiperkalcijemijom (Cvitković i sur., 2006; Warrell i sur., 1991). Intravenska infuzija  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  u dozi od 200 mg/m<sup>2</sup> tijekom 5 dana pokazala se učinkovitijom od etidronata i jednako učinkovitom kao pamidronat u kontroli akutno povišenih vrijednosti kalcija u krvi. Na temelju dokazane učinkovitosti, FDA je 1991. odobrio upotrebu galijevog nitrata u liječenju hiperkalcijemije povezane s malignim oboljenjima. Stanje hiperkalcijemije posebno je opasno kod onkoloških pacijenata jer može dovesti do neurokognitivnih disfunkcija, zatajenja bubrega, stanja šoka i kome (Goldner, 2016). Mehanizam djelovanja galija na kosti razlikuje se od bisfosfonata. Galij potiče kristalizaciju hidroksiapatita, smanjuje topljivost mineralnih komponenti i resorpciju kosti smanjenjem sekrecije kiseline od strane osteoklasta. Pri tome inhibira protonsku pumpu na nabranoj membrani osteoklasta bez da inducira njihovu apoptozu (Bockman, 2003).

Nekoliko pretkliničkih studija potvrdilo je imunosupresivni i protuupalni učinak galija. Supkutana primjena galijevog nitrata u dozi 10 – 30 mg/kg tjedno suprimirala je pojavu znakova bolesti i patohistoloških promjena kod štakora u eksperimentalnom modelu autoimunog encefalitisa (Whitacre i sur., 1992). Sličan imunosupresivni učinak potvrđen je i u modelu sistemskog eritemskog lupusa kod miševa (Apseloff i sur., 1997). Protuupalno djelovanje dokazano je u modelu adjuvantnog artritisa kod štakora gdje je primjena galijevog nitrata suprimirala funkciju makrofaga i T-limfocita (Matković i sur., 1991). Navedeni imunosupresivni i protuupalni učinci nisu ispitani u kliničkim studijama (Chitambar, 2010).

### **1.5. Antimikrobni učinci galija**

Antimikrobni učinak galija i njegovih spojeva tema je mnogih istraživanja, ponajviše zbog rastuće problematike antimikrobne rezistencije te potrebe za otkrićem antimikrobnih tvari s novim mehanizmima djelovanja (Kelson i sur., 2013). Dokazano je da galij može

zamijeniti željezo u sideroforima (Emery, 1986). Na taj način, kompleks galija i siderofora može ući u mikrobnu stanicu jednim od mehanizama akvizicije siderofora. Utvrđeno je da siderofor piokelin transportira galij u *P. aeruginosa* (Frangipani i sur., 2014), a dokazana je i strukturna sličnost kompleksa željezo-piokelin i galij-piokelin (Porcaro i sur., 2017). Ulazak galija u stanicu preko siderofora ili u obliku kompleksa koji mikroorganizmima slične siderofore predstavlja dobar primjer strategije „trojanskog konja“ u razvoju novih antimikrobnih spojeva (Kelson i sur., 2013). Zbog svoje sličnosti sa željezom, galij u mikrobnj staniци može inhibirati mnoge stanične procese ovisne o željezu te ostvariti antimikrobni učinak. Dokaz za tu tvrdnju leži u činjenici da višak željeza u hranjivom mediju poništava sve do danas poznate antimikrobne učinke galija. Pretpostavlja se da mehanizam antimikrobnog djelovanja galija uključuje inhibiciju sinteze i popravka DNA, inhibiciju metaboličkih puteva i generiranje ROS-a (Minandri i sur., 2014). Identifikacija mutanta *P. aeruginosa* rezistentnog na  $Ga^{3+}$  otkrila je 64 točkaste mutacije u genima uključenim u metabolizam, membranski transport, replikaciju, rekombinaciju i popravak DNA, produkciju energije i sintezu siderofora što potvrđuje uključenost galija u široki spektar unutarstaničnih procesa (García-Contreras i sur., 2013).

Metodom mikrodilucije određene su minimalne inhibitorne koncentracije galijevog nitrata za 9 različitih bakterijskih sojeva. Utvrđen je MIK od 256  $\mu\text{g/mL}$  za *E. coli* i *E. faecalis* te 512  $\mu\text{g/mL}$  za *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *S. aureus* i *S. epidermidis*. U nastavku istraživanja, podaci dobiveni elektronskim mikroskopom pokazali su da je galij uzrokovao odvajanje bakterijske stanične stijenke i stanične membrane, nakupljanje unutarstaničnih proteina i kondenzaciju DNA (Xu i sur., 2017).  $Ga(\text{NO}_3)_3$  pokazao se učinkovitim i u inhibiciji porasta 58 različitih sojeva *A. baumannii* (uključujući MDR sojeve) uz MIK vrijednosti 2 – 80  $\mu\text{M}$  na mediju siromašnom željezom te 4 – 64  $\mu\text{M}$  u humanom serumu (Antunes i sur., 2012). Najveći antimikrobni potencijal galij je pokazao kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. U jednom je istraživanju dokazano da povećanjem doze  $Ga(\text{NO}_3)_3$  iznad 1  $\mu\text{M}$  raste i inhibitorni učinak na *P. aeruginosa* u *in vitro* uvjetima. Također je utvrđeno da galij smanjuje unos željeza u bakteriju te suprimira regulator transkripcije *pvdS* koji regulira proizvodnju siderofora pioverdina. Najveću učinkovitost galij je pokazao u inhibiciji stvaranja biofilma *P. aeruginosa*. Već pri koncentraciji od 0,5  $\mu\text{g/mL}$  primijećen je izostanak stvaranja biofilma. Kod već stvorenog biofilma,  $Ga(\text{NO}_3)_3$  u koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  ubio je većinu bakterija u biofilmu tijekom 72 sata, a pokazao se posebno učinkovitim na bakterije smještene u središtu biofilma. U *in vivo*

ispitivanju, jednokratna inhalacija koncentriranog  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  (250 mM) gotovo u potpunosti spriječila je smrt miševa izloženih letalnoj dozi intratrahealnog inokuluma visokovirulentnog soja *P. aeruginosa* (Kaneko i sur., 2007). Galijev nitrat također se pokazao učinkovitim i protiv *Mycobacterium tuberculosis*. Inhibirao je porast bakterije na hranjivoj podlozi, ali i unutar uzgojenih humanih makrofaga. U *in vivo* pokusu, svi miševi tretirani s 10 mg/kg  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  intraperitonealno preživjeli su infekciju s *M. tuberculosis*. Pri tome je utvrđeno da je galij inhibirao enzime ribonucleotid reduktazu za 50 – 60 % i akonitazu za 90% (Olahanmi i sur., 2013). Antifungalni učinak galijevog nitrata istražen je na nekoliko primjera. Fungistatsko djelovanje dokazano je na azol-osjetljivim i azol-rezistentnim sojevima *A. fumigatus* uz MIK vrijednosti 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dodatak željeza u hranjivi mediji povećao je MIK iz čega se zaključuje da antifungalni učinak galija potječe od kompeticije sa željezom.  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  također je pokazao sinergistički učinak s kaspofunginom na *A. fumigatus*. Na vrstama roda *Candida*,  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  djelovao je fungistatski s minimalnim inhibitornim koncentracijama u rasponu 16 – 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , i to kod MDR *C. auris*, *C. glabrata*, *C. haemulonii* i *C. duobushaemulonii* (Bastos i sur., 2019).

Galijev citrat najjednostavniji je galijev kompleks koji je pokazao antimikrobni učinak. U usporednom istraživanju, galijev citrat djelovao je baktericidno na kliničke izolate *P. aeruginosa* s nižim MIK vrijednostima od kompleksa galija i desferioksamina B. Galij u obliku citrata efikasnije je ulazio u *P. aeruginosa*, a dokazano je da uzrokuje smanjenu bioraspodivnost glutamata, ključnog metabolita za *P. aeruginosa* (Rzhepishavska i sur., 2011). I druga istraživanja potvrdila su učinkovitost galijevog citrata na *P. aeruginosa* (MIK=0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ali i ostale Gram-negativne bakterije te su trenutno u tijeku klinička ispitivanja inhalacijskog oblika galijevog citrata u terapiji kroničnih respiratornih infekcija pacijenata oboljelih od cistične fibroze (Kelson i sur., 2013). Galij u obliku kompleksa galijevog maltolata pri koncentracijama 50 – 200  $\mu\text{M}$  inhibirao je rast *S. aureus* i MRSA za više od 90% tijekom 36 sati u *in vitro* uvjetima. U istom istraživanju utvrđene su MIK vrijednosti galijevog maltolata manje od 1 mg/mL za preko 50% kliničkih izolata MRSA (Arnold i sur., 2012). U *in vivo* istraživanjima, galijev je maltolat u dozi od 25 mg/kg primijenjen supkutano postigao 100%-tno preživljenje miševa u modelu akutne infekcije *P. aeruginosa* nakon termalne ozljede. Također, galijev maltolat značajno je smanjio kolonizaciju ozljede s *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *A. baumannii* (DeLeon i sur., 2009). Antibakterijski učinak pokazao je i već spomenuti kompleks galija i protoporfirina, i to na MRSA, *A. baumannii* i *K. pneumoniae*, uz MIK 0.0156 – 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Stojiljković i sur.,

1999). Nedavna studija ispitala je učinak galijeveg nitrata, galijeveg maltolata i galij-protoporfirin IX kompleksa (Ga-PPIX) na ESKAPE patogene u *in vitro* uvjetima. Učinkovitima su se pokazali galijev nitrat i galijev maltolat na *A. baumannii*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* sojevima (MIK iznosi 0,5 – 16 µg/mL) te Ga-PPIX na *S. aureus* i *A. baumannii* (MIK iznosi 0,06 – 32 µg/mL) (Hijazi i sur., 2018). U ovoj, ali i mnogim drugim studijama potvrđeno je da galij zaobilazi postojeće mehanizme rezistencije (efluks pumpe, beta-laktamaze, promjene u permeabilnosti membrane, inhibiciju stvaranja porina...) te ima sasvim novi mehanizam antimikrobnog djelovanja.

## 1.6. Kompleksi galija i hidrazona

Galij u obliku soli ima mnogobrojna loša farmakokinetička svojstva koja ograničavaju njegovu terapijsku primjenu. Otopljen u vodi ili fiziološkoj otopini, galij stvara izrazito kisele otopine i taloži se u obliku teško topljivih hidroksida. Kako bi se izbjegao taj problem, pribjeglo se stvaranju kompleksa galija s organskim ligandima (npr. citratom) koji imaju poboljšanu stabilnost i bioraspoloživost. Hidrazoni su poznati kelatori željeza, ali i galija te mogu s njim stvarati stabilne komplekse. U nekoliko istraživanja, takvi kompleksi pokazali su antitumorski i antimikrobni učinak (Lessa i sur., 2012).

Utvrđeno je da kompleksi galija i *N*(4)-fenil-2-piridin tiosemikarbazona posjeduju značajno bolji antimikrobni učinak na ispitanom soju *P. aeruginosa* (MIK = 42 – 75 µM) u odnosu na galijev nitrat (MIK = 667 µM) i na same ligande (MIK = 111 – 736 µM), a usporediv s tetraciklinom (MIK = 24 µM) (da Silva i sur., 2009). Sličan učinak primijećen je i za komplekse galija i 2-piridiniformamid tiosemikarbazona koji su djelovali fungistatski na vrste roda *Cryptococcus* (MIK = 2 – 26 µM) u nižim koncentracijama nego sami ligandi i galijev nitrat, a usporedivo s flukonazolom (Bastos i sur., 2010). U jednom istraživanju ispitan je učinak novosintetiziranog kompleksa galija i aroilhidrazona 2-okso-2-[*N*-(2,4,6-trihidroksi-benzil)-hidrazino]-acetamida u omjeru 1:2 na stvaranje biofilma *P. aeruginosa*. Navedeni je kompleks pokazao bolji antibiofilmski učinak u odnosu na galijev nitrat, a istovremeno je inhibirao produkciju toksina preko T3SS sekrecijskog sustava *P. aeruginosa* (Rzhepishevska i sur., 2014).

Poznavajući dokazane antimikrobne učinke kako aroilhidrazona, tako i galija, njihova kombinacija nameće se kao nova varijacija strategije „trojanskog konja“, pri čemu hidrazoni služe kao „transporteri“ galija u mikrobnu stanicu. Istovremeno, takvi spojevi u jednom kompleksu sadrže dvije tvari s poznatim antimikrobnim učinkom (Lessa i sur., 2012).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Antimikrobna rezistencija prerasla je u jednu od najvećih zdravstvenih prijetnji 21. stoljeća. Pojava „multi-drug resistant“ sojeva bakterija i gljivica veliki je zdravstveni problem, najviše unutar skrbi u bolničkim sustavima. Kao najopasniji uzročnici bolničkih (nozokomijalnih) infekcija pokazali su se tzv. ESKAPE patogeni (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.) koji su razvili mehanizme rezistencije na sve postojeće antibiotike korištene u kliničkoj praksi. Iz tog razloga mnogi rutinski medicinski postupci postaju visokorizični za razvoj po život opasnih infekcija. Potreba za otkrićem novih antimikrobnih tvari s novim mehanizmima djelovanja koji zaobilaze postojeće mehanizme rezistencije veća je nego ikad. Mikrobni metabolizam željeza pokazao se kao dobra meta za antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Metal galij (Ga) zbog svojih sličnosti sa željezom i nemogućnosti bioloških sustava da ih razlikuju predstavlja potencijalni inhibitor mikrobnih metaboličkih puteva ovisnih o željezu koji su esencijalni za preživljenje kako bakterija tako i gljivica. Ulazak galija u mikrobnu stanicu najčešće je posredovan sideroforima, kelatorima željeza koje proizvode mikroorganizmi. Na temelju iskorištavanja željeza domaćina preko siderofora, razvijena je nova antimikrobna strategija, tzv. koncept „trojanskog konja“ koji podrazumijeva upotrebu tvari sličnih sideroforima koje bakterije smatraju izvorima željeza te ih aktivno unose u stanicu. Dolazak na tržište prvog siderofornog antibiotika cefiderokola nagovještava da je takva strategija dobar put za razvoj novih antimikrobnih spojeva. Hidrazoni i aroilhidrazoni tvari su s poznatim antimikrobnim učincima koje su ujedno i kelatori željeza, odnosno galija. Kompleksi hidrazona i galija pokazuju povećanu stabilnost i bioraspoloživost od samog galija, a ujedno predstavljaju kombinaciju dviju tvari s poznatim antimikrobnim učinkom u jednom spoju. Dosadašnja istraživanja pokazuju da takvi kompleksi posjeduju izražen antibakterijski i antifungalni učinak u nižim koncentracijama od samih liganada ili samog galija.

Cilj je ovog rada utvrditi pokazuju li novosintetizirani kompleksi aroilhidrazona (izvedenih iz salicilaldehida i hidrazida nikotinske kiseline) sa željezom i galijem antimikrobni učinak u uvjetima *in vitro* na referentnim, a zatim i rezistentnim kliničkim izolatima sojeva bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* te gljivične vrste *Candida albicans*. U tu svrhu korišteno je nekoliko *in vitro* metoda:

- 1) ispitivanje mikrobiološke aktivnosti metodom difuzije u agaru

- 2) određivanje najmanjih koncentracija pri kojima mikrobiološki aktivni kompleksi postižu 50%-tno, odnosno 90%-tno (minimalna inhibitorna koncentracija) smanjenje porasta ispitivanih sojeva u hranjivom mediju korištenjem metode mikrodilucije
- 3) ispitivanje antimikrobnog učinka u vremenu za spoj s određenom najnižom minimalnom inhibitornom koncentracijom na odgovarajućem mikrobnom soju korištenjem tzv. „time-kill“ metode.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Vrste mikroorganizama

U istraživanju su korišteni standardni (referentni) laboratorijski sojevi mikroorganizama iz ATCC zbirke (American Type Culture Collection, SAD) te rezistentni klinički sojevi iz MFBF zbirke (Zbirka mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska). Ispitivane bakterijske vrste uključivale su: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (meticilin-osjetljiv soj, u daljnjem tekstu *S. aureus* ATCC), meticilin-rezistentni *S. aureus* MFBF 177 (u daljnjem tekstu MRSA), *Escherichia coli* ATCC 10536 (u daljnjem tekstu *E. coli* ATCC) te prošireni spektar beta-laktamaza pozitivnu *E. coli* MFBF 12794 (u daljnjem tekstu ESBL+ *E. coli*). Ispitivane gljivične vrste uključivale su *Candida albicans* ATCC 10231 (flukonazol-osjetljiv soj, u daljnjem tekstu *C. albicans* ATCC) i flokonazol-rezistentnu *C. albicans* MFBF 11100 (u daljnjem tekstu *C. albicans*<sup>FLR+</sup>).

#### 3.2. Hranjive podloge

Od mikrobioloških hranjivih podloga, u radu s bakterijskim vrstama korišteni su triptikaza-sojin agar, TSA (Merck, Njemačka), Müller-Hintonov agar, MHA (Merck, Njemačka) te Müller-Hintonov bujon, MHB (Merck, Njemačka). U radu s gljivičnim vrstama korišten je Sabouraudov agar, Sab (Merck, Njemačka). Sav navedeni mikrobiološki materijal steriliziran je autoklaviranjem 15 minuta pri temperaturi 121°C i tlaku 1,2 bar. Nakon autoklaviranja, krute hranjive podloge razlivene su u PVC Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm). Kao tekuća hranjiva podloga za uzgoj gljivica korišten je komercijalni RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, SAD) u koji je aseptički dodano 2% (m/V) glukoze (RPMI 2% G). Sve hranjive podloge svježe su pripremljene i čuvane na temperaturi 2 – 8 °C do upotrebe, a iskorištene su u roku od nekoliko dana.

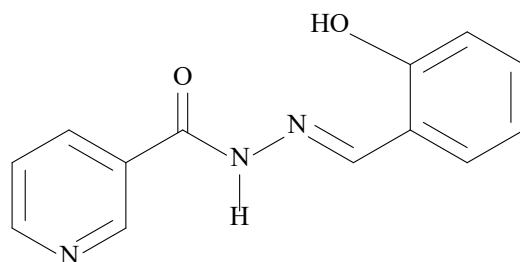
#### 3.3. Otapala i drugi materijal

Komercijalno dostupna organska otapala dimetil-sulfoksid čisti, DMSO (Lach-Ner, Češka) i aceton p.a. (GRAM-MOL, Hrvatska) čuvana su u propisanim uvjetima i korištena bez daljnjeg pročišćavanja. Destilirana voda (H<sub>2</sub>O), fiziološka otopina pH 7.0 (0.9% m/m NaCl) i fosfatom puferirana otopina (PBS) pH 7.0 priređeni su „in house“, sterilizirani

autoklaviranjem 15 minuta pri temperaturi 121°C i tlaku 1,2 bar te čuvani na sobnoj temperaturi do upotrebe.

### 3.4. Fe i Ga kompleksi aroilhidrazona

Ukupno je korišteno 13 kompleksa aroilhidrazona, derivata hidrazida nikotinske kiseline i različito supstituiranih salicilaldehida (slika 9), od toga šest kompleksa sa željezom i sedam kompleksa s galijem.



**Slika 9.** Struktura aroilhidrazona dobivenog iz salicilaldehida i hidrazida nikotinske kiseline

Kompleksi sa željezom (1 – 3, 8 – 10) sintetizirani su na Zavodu za analitičku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koristeći prethodno opisane postupke sinteze i standardizirane analitičke metode za utvrđivanje strukture i stupnja čistoće (Benković i sur., 2019.). Kompleksi s galijem (4 – 7, 10 – 13) sintetizirani su prema dosad neobjavljenim podacima. Izvagano je približno 10 mg svakog kompleksa, otopljeno u 1 mL čistog DMSO i pohranjeno na temperaturi 2 – 8 °C do upotrebe. Ispitivani kompleksi prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Kompleksi aroilhidrazona sa željezom i galijem korišteni u istraživanju

kompleks	ligand (aroilhidrazon)	metal	omjer ligand : metal
spoj 1	L1	Fe	2 : 1
spoj 2	L2	Fe	2 : 1
spoj 3	L3	Fe	2 : 1
spoj 4	L4	Ga	2 : 1
spoj 5	L1	Ga	2 : 1
spoj 6	L2	Ga	2 : 1
spoj 7	L3	Ga	2 : 1
spoj 8	L5	Fe	2 : 1
spoj 9	L6	Fe	2 : 1
spoj 10	L7	Fe	2 : 1
spoj 11	L5	Ga	2 : 1
spoj 12	L6	Ga	2 : 1
spoj 13	L7	Ga	2 : 1

### **3.5. Galijev(III) nitrat**

Kao poredbena tvar, u istraživanju je korištena krutina  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (Thermo Fisher, Njemačka). Vaganjem i otapanjem u sterilnoj destiliranoj vodi pripravljena je otopina približne koncentracije 10 mg/mL i pohranjena na temperaturi 2 – 8 °C do upotrebe.

### **3.6. Antimikrobni lijekovi**

Kao pozitivne kontrole korištene su otopine sljedećih antimikrobnih lijekova: gentamicin sulfat (Sigma-Aldrich, SAD), vankomicin (Sigma-Aldrich, SAD), ampicilin (Sigma-Aldrich, SAD), norfloksacin (Krka, Slovenija), kolistin (Sigma-Aldrich, SAD), fosfomicin (PharmaS, Hrvatska), vorikonazol (Pfizer, SAD) i nistatin (Fagron, Grčka). Sve otopine pripravljene su otapanjem krutine u odgovarajućem otapalu te su pohranjene na -20°C i iskorištene u roku nekoliko dana.

### **3.7. Uzgoj mikroorganizama**

Bakterijski sojevi *S. aureus* ATCC, MRSA, *E. coli* ATCC i ESBL+ *E. coli* nasadeni su na TSA agar te inkubirani 18 sati na 37 °C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan). Sojevi *C. albicans* ATCC i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> nasadeni su na Sab agar te inkubirani 48 sati na 37 °C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan).

### **3.8. Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti metodom difuzije u agaru („agar-well diffusion“)**

#### **3.8.1. Priprema radnih otopina Fe i Ga kompleksa aroilhidrazona**

Pohranjene otopine 13 kompleksa aroilhidrazona u DMSO-u (3.4.) približne koncentracije 10 mg/mL razrijeđene su sterilnom destiliranom vodom u omjeru 1 naprema 9 volumnih jedinica neposredno prije upotrebe. Konačna koncentracija radnih otopina iznosila je približno 1 mg/mL.

#### **3.8.2. Priprema inokuluma**

Inokulumi bakterijskih sojeva (*S. aureus* ATCC, MRSA, *E. coli* ATCC i ESBL+ *E. coli*) pripravljani su suspendiranjem kolonija naraslih na TSA agaru (3.7.) u fiziološkoj otopini tako da je optička gustoća konačne suspenzije izmjerena denzitometrom DEN-1 (Kisker Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka) iznosila 0,5 McFarlanda što odgovara  $1.5 \times 10^8$

CFU/mL. Navedene suspenzije razrijeđene su fiziološkom otopinom u omjeru 1:9 (v/v). Inokulumi *C. albicans* ATCC i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> pripremljeni su suspendiranjem kolonija naraslih na Sab agaru (3.7.) u fiziološkoj otopini tako da je optička gustoća konačne suspenzije izmjerena denzitometrom DEN-1 (Kisker Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka) iznosila 0,5 McFarlanda što odgovara  $5 \times 10^6$  blastospora/mL.

### 3.8.3. Metoda cilindara

Mikrobiološka aktivnost Fe i Ga kompleksa aroilhidrazona ispitana je „agar-well diffusion“ metodom po uzoru na autora Balouri i sur. (2016) uz modifikacije. Korištene su Petrijeve ploče s Müller-Hintonovim agarom za bakterijske, odnosno ploče sa Sabouraudovim agarom za gljivične sojeve. Sterilni bris umočen je u pripremljeni inokulum pojedinog soja te ravnomjerno razmazan po površini odgovarajućeg agara u vodoravnim i okomitim smjerovima. Pomoću sterilnih čeličnih cilindara promjera 6 mm i visine 10 mm u podlozi su izbušene rupice, pri čemu je njihova međusobna udaljenost, kao i udaljenost od ruba Petrijeve zdjelice iznosila najmanje 20 mm (kako bi se jasno mogla očitati zona inhibicije). U svaku je rupicu mikropipetom nanoseno po 50 µL radnih otopina spojeva 1 – 13 koncentracije 1 mg/mL. U zasebnu rupicu nanoseno je 50 µL otopine Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (3.5.) kao i 50 µL 10%-tne (v/v) otopine DMSO-a. Kao pozitivne kontrole korišteni su sljedeći antimikrobni lijekovi: gentamicin sulfat u koncentraciji 10 µg/mL (kontrola za *S. aureus* ATCC), vankomicin u koncentraciji 100 µg/mL (kontrola za MRSA), norfloksacin u koncentraciji 10 µg/mL (kontrola za *E. coli* ATCC), kolistin u koncentraciji 100 µg/mL (kontrola za ESBL+ *E. coli*), vorikonazol u koncentraciji 10 µg/mL (kontrola za *C. albicans* ATCC) te nistatin u koncentraciji 100 µg/mL (kontrola za *C. albicans*<sup>FLR+</sup>). Sve navedene otopine antimikrobnih lijekova dobivene su razrjeđivanjem fiziološkom otopinom iz odgovarajućih koncentriranih otopina (3.6.) neposredno prije upotrebe. Difuzija ispitivanih sredstava u podlogu omogućena je ostavljanjem Petrijeve zdjelice 60 minuta na +4°C (hladnjak), a nakon toga se provela inkubacija kultura. Bakterijske kulture inkubirale su se 18, a kulture vrste *C. albicans* 48 sati na 37 °C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan). Test je proveden u triplikatu. Rezultati su očitani kao zona inhibicije oko rupice u kojoj nema rasta mikroorganizama. Promjer zone inhibicije izmjeren je ravnalom, s točnošću od 1 mm.

### 3.8.4. Statistička obrada podataka

Rezultati metode difuzije u agaru prikazani su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija triju nezavisnih eksperimenata, a izraženi u milimetrima. Postojanje statistički značajne razlike među rezultatima određeno je primjenom jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA) uz Tukeyev post-hoc test. Statistička analiza provedena je korištenjem programa Minitab® 17 for Windows, Minitab LLC, State College, Pennsylvania, SAD, [www.minitab.com](http://www.minitab.com).

## 3.9. Određivanje antimikrobnog učinka metodom mikrodilucije

### 3.9.1. Priprema radnih otopina Fe i Ga kompleksa aroilhidrazona

Pohranjene otopine 13 kompleksa aroilhidrazona u DMSO-u (3.4.) približne koncentracije 10 mg/mL razrijeđene su sterilnom destiliranom vodom u omjeru 1 naprema 9 volumnih jedinica neposredno prije upotrebe. Konačna koncentracija radnih otopina iznosila je približno 1 mg/mL.

### 3.9.2. Priprema inokuluma

Inokulumi bakterijskih sojeva (*S. aureus* ATCC, MRSA, *E. coli* ATCC i ESBL+ *E. coli*) pripremljeni su suspendiranjem kolonija naraslih na TSA agaru (3.7.) u fiziološkoj otopini tako da je optička gustoća konačne suspenzije izmjerena denzitometrom DEN-1 (Kisker Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka) iznosila 0,5 McFarlanda što odgovara  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL. Navedene suspenzije razrijeđene su Müller-Hintonovim bujonom u omjeru 1:9 (v/v). Inokulumi *C. albicans* ATCC i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> pripremljeni su suspendiranjem kolonija naraslih na Sab agaru (3.7.) u fiziološkoj otopini tako da je optička gustoća konačne suspenzije izmjerena denzitometrom DEN-1 (Kisker Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka) iznosila 0,5 McFarlanda što odgovara  $5 \times 10^6$  blastospora/mL. Navedene suspenzije razrijeđene su tekućom hranjivom podlogom RPMI 2% G u omjeru 1:9 (v/v).

### 3.9.3. Metoda mikrodilucije

Mikrodilucijskom metodom utvrđene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ispitivanih kompleksa aroilhidrazona i  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  prema preporukama EUCAST protokola (EUCAST E.Dis 5.1 (2003) za bakterije i EUCAST E.Def. 7.3.2. (2020) za gljivice). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) definirana je kao najniža koncentracija (u  $\mu\text{g/mL}$ )

ispitivanih tvari koja inhibira 90% porasta mikroorganizama u usporedbi s negativnom kontrolom.

Postupak je proveden u sterilnim polistirenskim mikrotitarskim pločicama ravnog dna s 96 jažica nominalnog volumena 300  $\mu\text{L}$  (Kartell S.p.A., Italija). U svaku je jažicu dodano 100  $\mu\text{L}$  Müller-Hintonovog bujona (za bakterije) ili 100  $\mu\text{L}$  tekuće hranjive podloge RPMI 2% G (za gljivice). Zatim je u prvu jažicu svakog stupca mikrotitarske pločice dodano 100  $\mu\text{L}$  radne otopine spojeva 1 – 13, koncentracije 1 mg/mL. Nakon toga, za svaki je spoj provedeno dvostruko serijsko razrjeđenje u jažicama A – H što znači da je u pojedinoj jažici koncentracija ispitivane tvari upola manja od koncentracije iste te tvari u prethodnoj jažici. Na kraju su sve jažice inokulirane s po 100  $\mu\text{L}$  svježe pripremljenog inokuluma odgovarajućeg bakterijskog (*S. aureus* ATCC, MRSA, *E. coli* ATCC i ESBL+ *E. coli*) ili gljivičnog soja (*C. albicans* ATCC i *C. albicans*<sup>FLR+</sup>). Ukupni volumen u svakoj jažici iznosio je 200  $\mu\text{L}$ , a konačne koncentracije ispitivanih spojeva bile su u rasponu 250 – 1,95  $\mu\text{g/mL}$ . Isti postupak proveden je i za otopinu  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  (3.5.). Usporedno je napravljeno dvostruko serijsko razrjeđenje ispitivanih spojeva bez inokuluma (u svrhu određivanja pozadinske apsorbancije), dvostruko serijsko razrjeđenje DMSO-a u rasponu 2,5 – 0,02 % (v/v), pozitivna kontrola s otopinama antimikrobnih lijekova (gentamicin sulfat, ampicilin, fosfomicin i nistatin) te negativna kontrola koja nije sadržavala ispitivane tvari. Sve mikrotitarske ploče inkubirane su 24 sata na 37 °C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan). Test je proveden u triplicatu. Cijeli postupak shematski je prikazan na slici 10.

#### **3.9.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije mjerenjem optičke gustoće**

Nakon 24-satne inkubacije, optička gustoća u pojedinoj jažici mikrotitarske pločice očitana je kao apsorbancija na 540 nm. U tu svrhu korišten je čitač mikrotitarskih pločica (Labsystems iEMS Reader MF, Finska).

#### **3.9.5. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije TTC-formazan testom**

Nakon mjerenja optičke gustoće, minimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih tvari na bakterijskim sojevima određene su TTC-formazan testom po uzoru na rad autora Polović i sur. (2019) uz modifikacije. Redoks indikator 2,3,5-trifeniltetrazolin klorid, TTC (Sigma-Aldrich, Austrija) pripremljen je kao 1%-tna otopina (m/v) u sterilnoj fiziološkoj otopini te filtriran kroz mikrobiološki filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  u sterilnu staklenu bočicu neposredno prije upotrebe. U svaku jažicu mikrotitarskih pločica s bakterijskim sojevima dodano je 20  $\mu\text{L}$

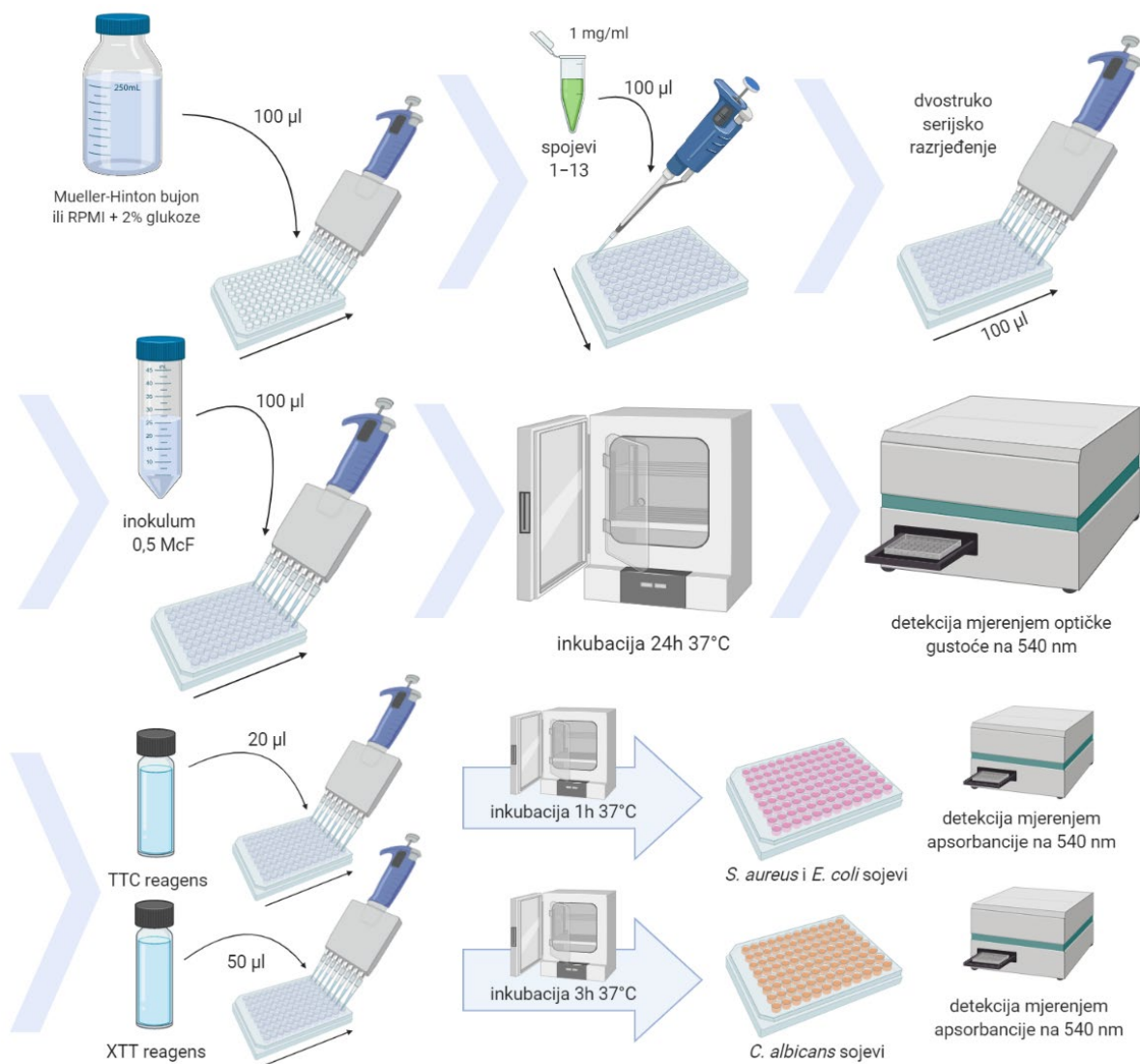
1%-tne otopine TTC-a te su pločice inkubirane sat vremena na 37 °C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan). Nakon inkubacije, očitana je apsorbancija na 540 nm korištenjem čitača mikrotitarskih pločica (Labsystems iEMS Reader MF, Finska).

### **3.9.6. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije XTT-formazan testom**

Nakon mjerenja optičke gustoće, minimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih tvari na gljivičnim sojevima određene su XTT-formazan testom po uzoru na rad autorice Richards i sur. (2008) uz modifikacije. Redoks indikator 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-tetrazolin-5-karboksanilid, XTT (Sigma-Aldrich, SAD) pripremljen je otapanjem 50 mg krutine u 50 mL sterilnog PBS-a. Dobivena je otopina XTT-a koncentracije 1 mg/mL koja je filtrirana kroz mikrobiološki filter veličine pora 0,45 µm u sterilnu staklenu bočicu. Uz to je pripremljena 10 mM otopina menadiona (Sigma-Aldrich, Kina) u acetonu. Neposredno prije primjene, 25 µL 10 mM otopine menadiona u acetonu dodano je u 50 mL 1 mg/mL otopine XTT-a. U svaku jažicu mikrotitarskih pločica s gljivičnim sojevima dodano je 50 µL pripremljene otopine XTT-a te su pločice inkubirane tri sata na 37 °C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan). Nakon inkubacije, očitana je apsorbancija na 540 nm korištenjem čitača mikrotitarskih pločica (Labsystems iEMS Reader MF, Finska).

### **3.9.7. Statistička obrada podataka**

Minimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih tvari izračunate su korištenjem Gompertzovog modela nelinearne regresije iz funkcije ovisnosti postotka vijabilnosti mikroorganizma o logaritmu koncentracije ispitivane tvari (računalni program GraphPad Prism v. 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Na isti način izračunat je i IC<sub>50</sub> kao najniža koncentracija (u µg/mL) ispitivanih tvari koja inhibira 50% porasta mikroorganizama u usporedbi s negativnom kontrolom. Konačni rezultati izraženi su kao aritmetičke sredine triju nezavisnih eksperimenata.



**Slika 10.** Shematski prikaz metode mikrodilucije, autorski rad, izrađeno pomoću <https://app.biorender.com/>

### 3.10. Određivanje kinetike stanične smrti vrste *C. albicans* („time-kill“ metoda)

Učinak kompleksa s najnižom vrijednosti MIK-a, koji je određen metodom mikrodilucije, ispitan je u ovisnosti o vremenu po uzoru na autoricu Zorić (2017). Za ispitivanje je odabran spoj 6 koji je pokazao najbolju aktivnost prema sojevima *C. albicans* ATCC i *C. albicans*<sup>FLR+</sup>.

#### 3.10.1. Priprema radne otopine spoja 6 (kompleks aroilhidrazona s galijem)

Pohranjena otopina spoja 6 - kompleksa aroilhidrazona s galijem u DMSO-u (3.4.) koncentracije 10,31 mg/mL razrijeđena je sterilnom destiliranom vodom u omjeru 1 naprema



9 volumnih jedinica neposredno prije upotrebe. Konačna koncentracija radne otopine iznosila je 1,031 mg/mL.

### 3.10.2. Priprema inokuluma

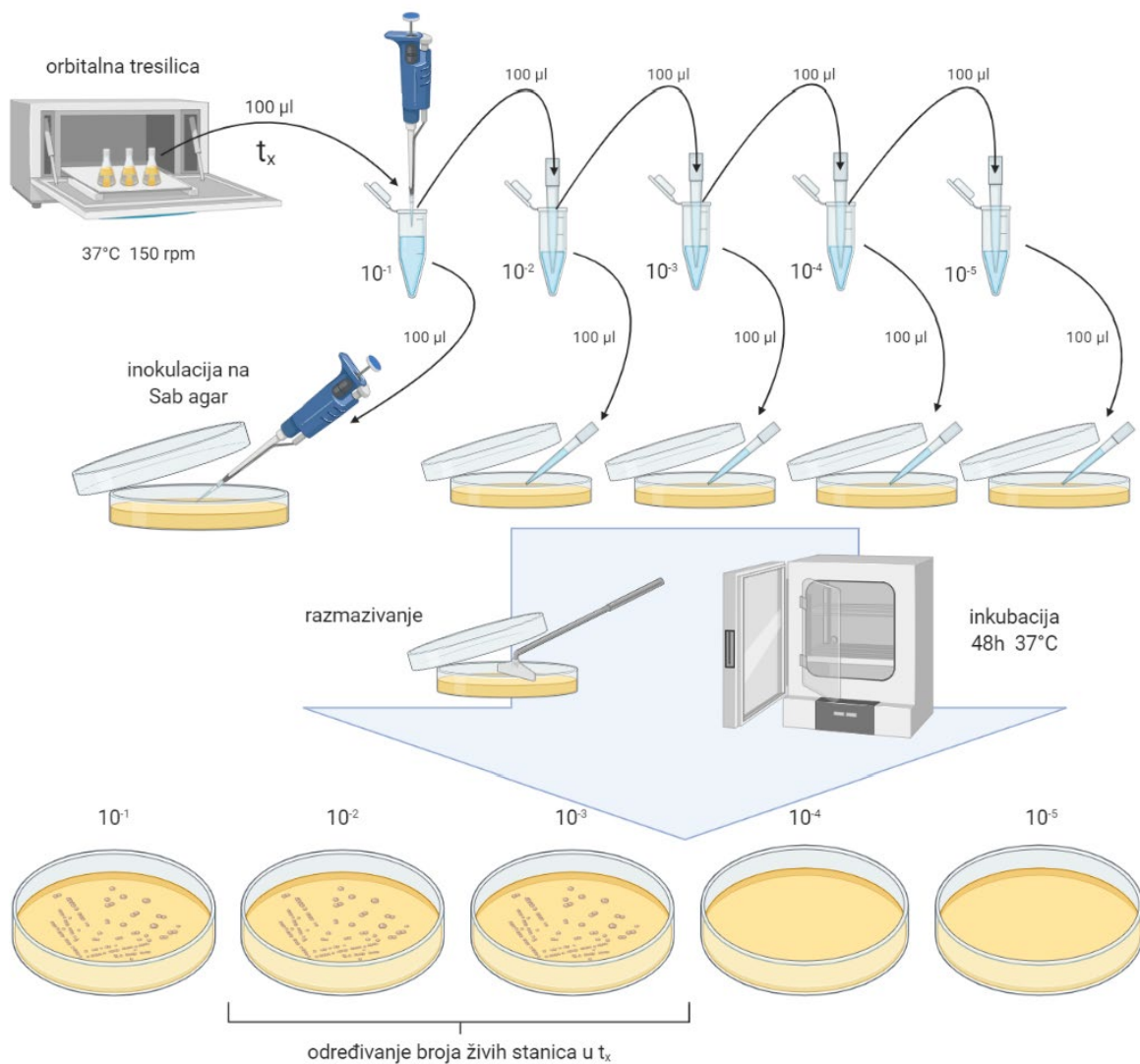
Blastospore *C. albicans* ATCC i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> narasle na Sab agaru (3.7.) presađene su u 10 mL tekuće hranjive podloge RPMI 2% G te inkubirane 24 sata na 37 °C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan). Nakon toga, Falcon epruvete s poraslim kandidama i hranjivim medijem centrifugirane su tri minute na 1200 rpm (Sorvall LYNX 4000 Centrifuge, Thermo Fisher, Njemačka) te je supernatant odliven. Inokulumi su pripremljeni suspendiranjem istaloženih kolonija u fiziološkoj otopini tako da je optička gustoća konačne suspenzije izmjerena denzitometrom DEN-1 (Kisker Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka) iznosila 0,5 McFarlanda što odgovara  $5 \times 10^6$  blastospora/mL.

### 3.10.3. „Time-kill“ metoda

U određivanju kinetike stanične smrti vrsta *C. albicans* ATCC i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> korištena je dvostruko veća koncentracija spoja 6 od eksperimentalno određenog MIK-a (32,02 µg/mL za *C. albicans* ATCC i 64,62 µg/mL za *C. albicans*<sup>FLR+</sup>). 1 mL suspenzije inokuluma gustoće 0,5 McFarlanda dodano je u 9 ml tekuće hranjive podloge RPMI 2% G koja je sadržavala 2 x MIK koncentraciju spoja 6. Udio DMSO-a u uzorcima iznosio je najviše 1,25 % (v/v). Usporedno je pripremljena negativna kontrola koja nije sadržavala ispitivani spoj. Pozitivna je kontrola izvedena s nistatinom (10 µg/ml, Fagron, Grčka). Svi su uzorci inkubirani na orbitalnoj tresilici (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant-bio, UK) na 150 rpm i 37 °C tijekom 24 sata. U predefiniranim vremenskim intervalima (0, 1, 2, 3, 5, 7 i 24 sata), 100 µl alikvota uzeto je iz tikvice s pojedinim uzorkom te serijski i deseterostruko razrijeđeno (1:10, v/v) sterilnom fiziološkom otopinom u sterilnoj Eppendorf epruvetici. Sva razrjeđenja pripremljena su u duplikatu. 100 µl svakog razrjeđenja preneseno je mikropipetom na čvrstu hranjivu podlogu (Sab agar), razmazano sterilnim L-štapićem i inkubirano 48 sati na 37 °C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan). Nakon inkubacije, na zadnja dva razrjeđenja s poraslim kolonijama određen je broj živih stanica u ovisnosti o vremenu. Cijeli postupak shematski je prikazan na slici 11. Srednja vrijednost broja mikroorganizama u pojedinom uzorku određena je prema sljedećoj formuli:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

pri čemu je  $N$  – broj mikroorganizama u uzorku (CFU/ml ili CFU/g);  $\Sigma C$  – zbroj poraslih kolonija na zadnja dva razrjeđenja;  $V$  – volumen inokuluma unesen na hranjivu podlogu;  $n_1$  – broj ploča u prvom razrjeđenju (od zadnja dva s poraslim kolnijama);  $n_2$  – broj ploča u drugom razrjeđenju (od zadnja dva s poraslim kolnijama);  $d$  – faktor dilucije prvog razrjeđenja (od zadnja dva s poraslim kolnijama). Konačni je rezultat prikazan kao graf ovisnosti broja kolonija, izraženih kao logaritam baze 10 broja mikroorganizama u CFU/mL, o vremenu u satima. Postojanje statistički značajne razlike među rezultatima određeno je primjenom Studentovog t-testa. U svrhu izrade grafa korišten je program GraphPad Prism v. 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Za statističku obradu podataka korišten je računalni program Minitab® 17 for Windows, Minitab LLC, State College, Pennsylvania, SAD, [www.minitab.com](http://www.minitab.com).



**Slika 11.** Shematski prikaz „time-kill“ metode, autorski rad, izrađeno pomoću

<https://app.biorender.com/>

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem metodom difuzije u agaru

Ukupno trinaest kompleksa aroilhidrazona (pri čemu su kompleksi numerirani brojevima 1 – 3 i 8 – 10 sadržavali željezo kao metal, a kompleksi 4 – 7 i 11 – 13 galij kao metal) ispitano je posjeduju li mikrobiološku aktivnost u uvjetima *in vitro*. Rezultati metode difuzije u agaru za referentne sojeve *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* prikazani su u tablici 2, a za rezistentne sojeve u tablici 3 te su izraženi kao aritmetičke sredine izmjerenih promjera zona inhibicije rasta u milimetrima  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm s. d.$ ) triju nezavisnih eksperimenata (N=3).

**Tablica 2.** Promjeri zona inhibicije rasta kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem za referentne sojeve *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*

ispitivana tvar	mikroorganizam		
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
	$\bar{x} \pm s. d.$ (mm)	$\bar{x} \pm s. d.$ (mm)	$\bar{x} \pm s. d.$ (mm)
spoj 1 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 2 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 3 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 4 (Ga)	10,00 $\pm$ 1,00*	18,00 $\pm$ 1,73	NI
spoj 5 (Ga)	10,00 $\pm$ 1,00*	19,33 $\pm$ 0,58	NI
spoj 6 (Ga)	11,67 $\pm$ 0,58*	19,00 $\pm$ 3,61	12,67 $\pm$ 1,15
spoj 7 (Ga)	10,33 $\pm$ 1,53*	17,33 $\pm$ 1,53	10,67 $\pm$ 0,58
spoj 8 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 9 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 10 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 11 (Ga)	10,00 $\pm$ 1,73*	NI	NI
spoj 12 (Ga)	10,33 $\pm$ 2,31*	11,67 $\pm$ 0,58	NI
spoj 13 (Ga)	10,67 $\pm$ 2,08*	NI	NI
Ga(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	13,33 $\pm$ 0,58	NI	NI*
DMSO 10% (v/v)	NI	NI	NI
pozitivna kontrola	16,00 $\pm$ 0,00 (gentamicin sulfat 10 $\mu$ g/mL)	23,67 $\pm$ 0,58 (norfloksacin 10 $\mu$ g/mL)	35,67 $\pm$ 2,08 (vorikonazol 10 $\mu$ g/mL)

NI = nema inhibicije

\* = vizualno uočen bakteriostatski/fungistatski učinak većeg promjera od izmjerene zone inhibicije

**Tablica 3.** Promjeri zona inhibicije rasta kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem za rezistentne sojeve *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*

ispitivana tvar	mikroorganizam		
	MRSA MFBF 177	ESBL+ <i>E. coli</i> MFBF 12794	<i>C. albicans</i> <sup>FLR+</sup> MFBF 11100
	$\bar{x} \pm s. d. (mm)$	$\bar{x} \pm s. d. (mm)$	$\bar{x} \pm s. d. (mm)$
spoj 1 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 2 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 3 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 4 (Ga)	10,33 ± 0,58*	10,00 ± 0,00*	NI
spoj 5 (Ga)	9,33 ± 0,58*	11,00 ± 0,00*	NI
spoj 6 (Ga)	10,00 ± 1,00*	10,33 ± 0,58*	12,33 ± 0,58
spoj 7 (Ga)	10,00 ± 1,73*	10,67 ± 0,58*	NI
spoj 8 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 9 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 10 (Fe)	NI	NI	NI
spoj 11 (Ga)	9,67 ± 1,15*	NI	NI
spoj 12 (Ga)	11,00 ± 2,00*	11,33 ± 0,58*	NI
spoj 13 (Ga)	10,67 ± 2,08*	NI	NI
Ga(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	9,33 ± 0,58	NI	NI*
DMSO 10% (v/v)	NI	NI	NI
pozitivna kontrola	18,33 ± 0,58 (vankomicin 100 µg/mL)	18,00 ± 0,00 (kolistin 100 µg/mL)	17,00 ± 1,73 (nistatin 100 µg/mL)

NI = nema inhibicije

\* = vizualno uočen bakteriostatski/fungistatski učinak većeg promjera od izmjerene zone inhibicije rasta

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kompleksi aroilhidrazona sa željezom ne pokazuju inhibitorni učinak ni na jednom od ispitivanih sojeva. Također, otapalo 10%-tni (v/v) DMSO nije pokazalo mjerljivi inhibitorni učinak.

Od kompleksa s galijem, spojevi 4, 5, 6, 7, 11, 12 i 13 inhibirali su porast i *S. aureus* ATCC 6538 i MRSA MFBF 177 soja s promjerima zona inhibicije rasta između 9,33 i 11,67 mm, uz napomenu da je vizualno primijećen i bakteriostatski učinak većeg promjera od izmjerene zone inhibicije. Najaktivniji se pokazao spoj 6 na *S. aureus* ATCC 6538 (zona inhibicije rasta 11,67 mm) te spoj 12 na MRSA MFBF 177 (zona inhibicije rasta 11 mm). Nije utvrđena statistički značajna razlika između promjera zona inhibicije rasta pojedinog

spoja na *S. aureus* ATCC 6538 i na MRSA MFBF 177 (one-way ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $\alpha=0.05$ ,  $p>0.05$ ). Ustanovljen je inhibitorni učinak galijevog nitrata u koncentraciji 10 mg/mL na *S. aureus* ATCC 6538 i MRSA MFBF 177 koji je pokazao zonu inhibicije rasta od 13,33, odnosno 9,33 mm. Svi promjeri zona inhibicije rasta aktivnih spojeva na *S. aureus* ATCC 6538 i MRSA MFBF 177 manji su od pozitivne kontrole koja je izvedena s gentamicin sulfatom, odnosno vankomicinom.

Spojevi 4, 5, 6, 7 i 12 djelovali su inhibitorno na *E. coli* ATCC 10536 uz promjere zone inhibicije rasta 11,67 – 19,33 mm kao i na ESBL+ *E. coli* MFBF 12794 uz promjere zone inhibicije rasta 10,00 – 11,33 mm. Najveća zona inhibicije rasta utvrđena je za spoj 5 kod *E. coli* ATCC 10536 (zona inhibicije rasta 19,33 mm) te za spoj 12 kod ESBL+ *E. coli* MFBF 12794 (11,33 mm). Dodatno je kod spojeva 4, 5, 6, 7 i 12 vizualno primijećen i bakteriostatski učinak većeg promjera od izmjerene zone inhibicije rasta za ESBL+ *E. coli* MFBF 12794. Statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika (one-way ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $\alpha=0.05$ ,  $p<0.05$ ) između učinka spojeva 4, 5, 6 i 7 na *E. coli* ATCC 10536 i na ostale sojeve kod kojih su ti spojevi aktivni. Svi promjeri zona inhibicije rasta aktivnih spojeva na *E. coli* ATCC 10536 i ESBL+ *E. coli* MFBF 12794 manji su od pozitivne kontrole koja je izvedena s norfloksacinom, odnosno kolistinom.

Inhibitorni učinak na rast *C. albicans* ATCC 10231 bio je mjerljiv samo za dva kompleksa aroilhidrazona s galijem, i to spojeve 6 (zona inhibicije 12,67 mm) i 7 (zona inhibicije 10,67 mm), dok je na *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 inhibitorno djelovao samo spoj 6 (zona inhibicije rasta 12,33 mm). Nema statistički značajne razlike (one-way ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $\alpha=0.05$ ,  $p>0.05$ ) između djelovanja spoja 6 na *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100. Vizualno je primijećen fungistatski učinak galijevog nitrata i na *C. albicans* ATCC 10231 i na *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100, ali bez mjerljive zone inhibicije rasta. Promjeri zona inhibicije rasta spojeva 6 i 7 na *C. albicans* ATCC 10231 manji su od pozitivne kontrole koja je izvedena s vorikonazolom, odnosno promjer zone inhibicije rasta spoja 6 na *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 manji je od pozitivne kontrole koja je izvedena s nistatinom.

## 4.2. Određivanje antimikrobnog učinka kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem metodom mikrodilucije

Metodom mikrodilucije određene su  $IC_{50}$  i  $IC_{90}$  (MIK) vrijednosti kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem (spojevi 1 – 13), galijevog nitrata te pozitivnih kontrola (gentamicin sulfat, ampicilin, fosfomicin i nistatin) na referentnim i kliničkim – rezistentnim sojevima *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*. Nakon izvođenja same metode, detekcija je provedena na dva načina: očitavanjem optičke gustoće na 540 nm i TTC-formazan testom za bakterijske sojeve te očitavanjem optičke gustoće na 540 nm i XTT-formazan testom za gljivične sojeve. Očitavanjem optičke gustoće poraslih mikroorganizama u mikrotitarskim pločicama saznajemo podatak o vijabilnosti, tj. broju mikrobnih stanica. U TTC-formazanskom testu, korištenjem TTC reagensa kojeg enzimi reduktaze samo iz živih bakterija reduciraju pri čemu nastaje crveno obojeni formazan (koji apsorbira u vidljivom dijelu spektra), saznajemo podatak o utjecanju ispitivanih spojeva na enzimsku aktivnost bakterija prisutnih u uzorku. Sličan je princip i XTT-formazanskog testa u kojem reduktaze iz živih gljivičnih stanica reduciraju XTT pri čemu nastaje narančasto obojeni formazanski produkt te se također saznaje informacija o utjecaju ispitivanih spojeva na enzimsku aktivnost gljivica u uzorku. Usporedno je proveden mikrodilucijski postupak za otapalo DMSO, u istom volumnom postotku kao i u uzorcima (2,5 – 0,02 vol%). Nakon statističke obrade podataka, kao lažno pozitivni odbačeni su svi rezultati za koje je ustanovljeno da DMSO u toj koncentraciji ima utjecaj 5 ili više posto na vijabilnost, odnosno enzimsku aktivnost pojedinog mikrobnog soja. Rezultati dobiveni čitačem mikrotitarskih pločica izraženi su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija triju nezavisnih mjerenja umanjeni za pripadajuće pozadinske apsorbancije (otopine ispitivanih kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem pokazuju obojenost u vidljivom spektru), podijeljeni s apsorbancijom pozitivne kontrole (netretirane stanice) i izraženi kao postotak.  $IC_{50}$  i  $IC_{90}$  (MIK) vrijednosti ispitivanih tvari određene su računalno korištenjem Gompertzovog modela nelinearne regresije iz funkcije ovisnosti postotka vijabilnosti mikroorganizma o logaritmu koncentracije ispitivane tvari.

Minimalne inhibitorne koncentracije ( $IC_{90}$ ) i  $IC_{50}$  vrijednosti ispitivanih kompleksa određene mjerenjem optičke gustoće na 540 nm prikazane su u tablici 4, dok su u tablici 5 prikazane  $IC_{50}$  i MIK ( $IC_{90}$ ) vrijednosti određene TTC testom za bakterije, odnosno XTT testom za gljivice.

**Tablica 4.** IC<sub>50</sub> i MIK (IC<sub>90</sub>) vrijednosti kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem određenih metodom mikrodilucije i mjerenjem optičke gustoće na 540 nm

ispitivana tvar	mikroorganizam											
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>E. coli</i> ATCC 10536		<i>C. albicans</i> ATCC 10231		MRSA MFBB 177		ESBL+ <i>E. coli</i> MFBB 12794		<i>C. albicans</i> <sup>FLR+</sup> MFBB 11100	
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)
spoj 1 (Fe)	>125	>125	>250	>250	112,1	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 2 (Fe)	>125	>125	233,88	>250	>250	>250	>125	>125	>250	>250	131,6	>250
spoj 3 (Fe)	>125	>125	213,80	>250	114,2	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 4 (Ga)	90,16	>125	66,07	104,9	118,6	>250	69,50	>125	57,41	174,1	98,32	129,0
spoj 5 (Ga)	>125	>125	53,70	<b>61,12</b>	106,2	154,7	>125	>125	58,34	<b>98,86</b>	123,9	203,0
spoj 6 (Ga)	36,64	>125	73,11	89,16	29,44	<b>37,28</b>	48,75	>125	81,10	113,3	61,80	<b>64,42</b>
spoj 7 (Ga)	62,66	<b>95,50</b>	82,04	97,69	72,61	79,97	82,34	<b>102,80</b>	116,95	>250	131,5	138,0
spoj 8 (Fe)	>125	>125	102,0	>250	167,1	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 9 (Fe)	>125	>125	>250	>250	>250	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 10 (Fe)	>125	>125	>250	>250	153,5	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 11 (Ga)	37,71	>125	93,40	>250	49,77	127,3	>125	>125	142,23	173,4	74,64	119,4
spoj 12 (Ga)	69,83	>125	81,56	107,9	114,8	157,0	>125	>125	156,68	>250	125,3	192,7
spoj 13 (Ga)	35,73	>125	88,51	>250	25,88	132,0	116,1	>125	>250	>250	103,5	156,3
Ga(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	171,8	317,7	203,2	286,8	123,0	162,6	94,19	292,2	230,7	303,3	120,5	155,2
gentamicin sulfat	0,047	0,467	NI		NI		0,058	0,618	NI		NI	
ampicilin	NI		7,112	11,38	NI		NI		>25	>25	NI	
fosfomicin	NI		8,017	11,45	NI		NI		1,396	9,414	NI	
nistatin	NI		NI		1,936	2,866	NI		NI		1,600	3,544

NI = nije ispitano

**Tablica 5.** IC<sub>50</sub> i MIK (IC<sub>90</sub>) vrijednosti kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem određenih metodom mikrodilucije i TTC-formazanskim testom za bakterijske sojeve, odnosno XTT-formazanskim testom za gljivične sojeve

ispitivana tvar	mikroorganizam											
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>E. coli</i> ATCC 10536		<i>C. albicans</i> ATCC 10231		MRSA MFBF 177		ESBL+ <i>E. coli</i> MFBF 12794		<i>C. albicans</i> <sup>FLR+</sup> MFBF 11100	
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIK (µg/mL)
spoj 1 (Fe)	>125	>125	>250	>250	91,10	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 2 (Fe)	>125	>125	162,93	>250	>250	>250	>125	>125	>250	>250	154,3	>250
spoj 3 (Fe)	>125	>125	>250	>250	131,1	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 4 (Ga)	47,97	>125	60,26	99,77	101,5	>250	71,45	>125	36,30	131,5	122,74	128,8
spoj 5 (Ga)	>125	>125	55,60	<b>59,60</b>	88,31	168,27	>125	>125	51,40	<b>111,2</b>	>250	>250
spoj 6 (Ga)	18,20	>125	61,94	92,13	26,30	<b>32,02</b>	63,39	>125	97,72	205,7	62,66	<b>64,62</b>
spoj 7 (Ga)	29,85	<b>97,95</b>	76,56	101,9	68,08	70,47	69,02	<b>109,1</b>	120,7	>250	68,23	73,89
spoj 8 (Fe)	>125	>125	232,7	>250	177,01	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 9 (Fe)	>125	>125	>250	>250	>250	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 10 (Fe)	>125	>125	>250	>250	153,82	>250	>125	>125	>250	>250	>250	>250
spoj 11 (Ga)	38,28	>125	151,36	>250	76,74	128,23	67,45	>125	165,0	>250	84,72	146,2
spoj 12 (Ga)	77,98	>125	117,2	129,4	152,05	198,61	>125	>125	193,6	>250	150,3	222,9
spoj 13 (Ga)	34,36	>125	104,23	>250	76,56	141,91	73,45	>125	>250	>250	135,2	208,9
Ga(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	102,1	451,6	167,5	322,5	117,8	160,5	132,7	323,5	220,3	293,3	107,2	152,1
gentamicin sulfat	0,015	0,406	NI		NI		0,052	0,187	NI		NI	
ampicilin	NI		9,057	11,30	NI		NI		>25	>25	NI	
fosfomicin	NI		11,117	12,22	NI		NI		2,455	7,790	NI	
nistatin	NI		NI		2,985	3,202	NI		NI		1,778	3,874

NI= nije ispitano



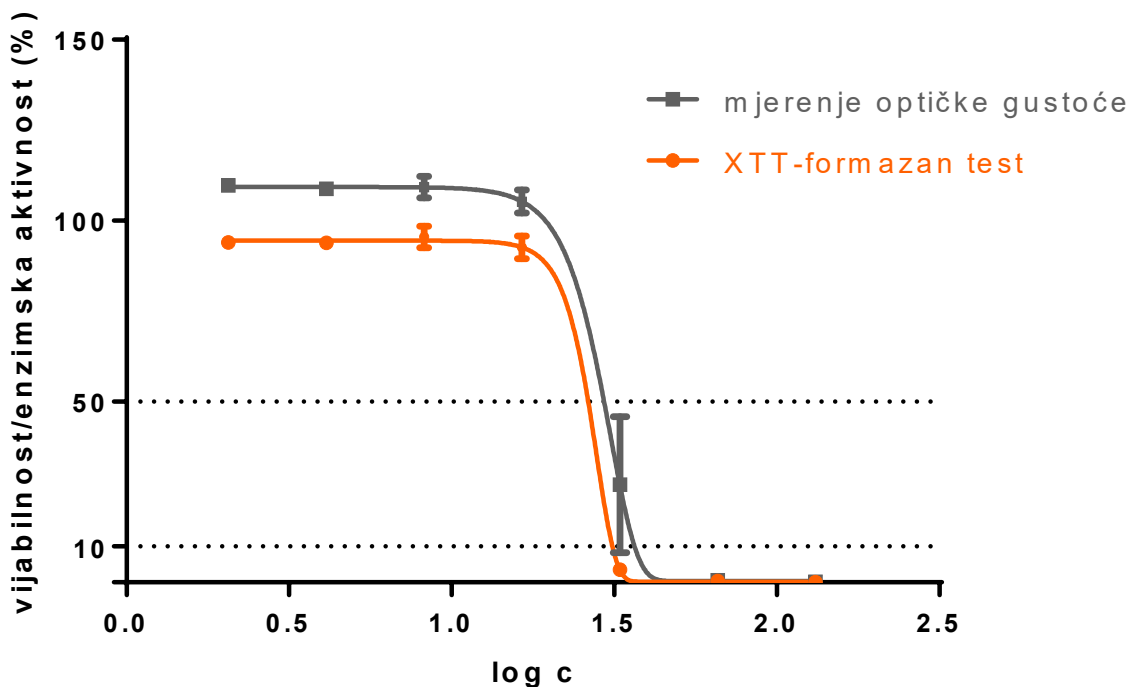
Na prvi pogled vidljivo je da kompleksi aroilhidrazona s galijem pokazuju bolji antimikrobni učinak u odnosu na komplekse sa željezom. Štoviše, nijedan ispitan kompleks aroilhidrazona sa željezom nije pokazao 90 % inhibicije ni kod jednog ispitanog mikrobnog soja u zadanim koncentracijama, dok su samo neki postigli 50 % inhibicije, ali tek pri visokim koncentracijama (spojevi 1 i 10 za *C. albicans* ATCC 10231, spoj 2 za *E. coli* ATCC 10536 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100, spojevi 3 i 8 za *E. coli* ATCC 10536 i *C. albicans* ATCC 10231).

Spoj 7 pokazao se najaktivnijim od svih ispitanih na *S. aureus* ATCC 6538 i MRSA MFBF 177. Jedini je inhibirao porast navedenih sojeva za 90%, i to u koncentracijama 95,50 – 109,1 µg/mL. Od ostalih kompleksa aroilhidrazona s galijem, spojevi 4, 6, 11, 12 i 13 postigli su 50% inhibicije rasta *S. aureus* ATCC 6538 pri koncentracijama 18,20 – 90,16 µg/mL, ali bez 90%-tne inhibicije do koncentracije od 125 µg/mL. Spojevi 4, 6, 11 i 13 inhibirali su rast MRSA MFBF 177 za 50 % pri koncentracijama 48,75 – 116,1 µg/mL, ali također bez 90%-tne inhibicije do 125 µg/mL. Važno je napomenuti da je MIK vrijednost spoja 7 niža od galijevog nitrata za *S. aureus* ATCC 6538, ali i značajno viša od gentamicina.

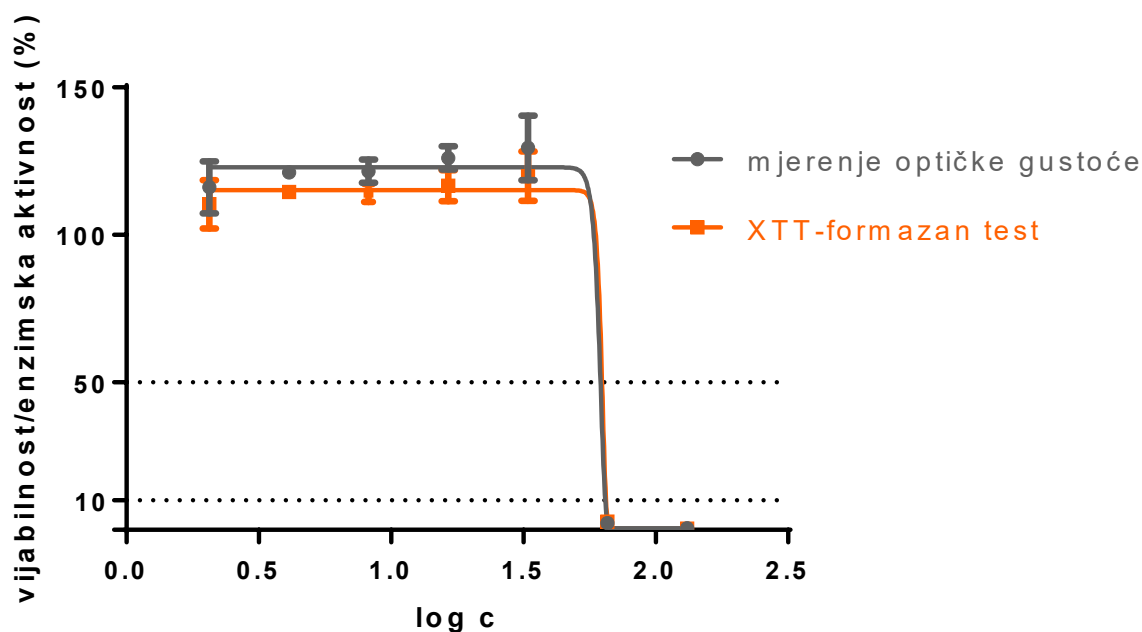
Pet različitih kompleksa aroilhidrazona s galijem (spojevi 4, 5, 6, 7 i 12) pokazali su dobru aktivnost prema *E. coli* ATCC 10536, uz minimalne inhibitorne koncentracije u rasponu 59,60 – 129,4 µg/mL. Najaktivniji se pokazao spoj 5 koji je inhibirao 90% rasta *E. coli* ATCC 10536 u koncentraciji 61,12 µg/mL (mjerenje optičke gustoće), odnosno 59,60 µg/mL (TTC-formazan test). Sve određene MIK vrijednosti kompleksa s galijem niže su od MIK-a galijevog nitrata za *E. coli* ATCC 10536, ali i više od kontrola izvedenih s ampicilinom i fosfomicinom. Spoj 5 također je najaktivniji i na ESBL+ *E.coli* MFBF 12794, uz MIK vrijednosti 98,86 µg/mL (mjerenje optičke gustoće) i 111,2 µg/mL (TTC-formazan test). Još jedino kod spojeva 4, 6 i 11 određene su MIK vrijednosti manje od 250 µg/mL za ESBL+ *E.coli* MFBF 12794, a kreću se između 113,3 µg/mL i 205,7 µg/mL. Navedene minimalne inhibitorne koncentracije također su manje od one za galijev nitrat, ali veće od fosfomicina na koji je ESBL+ *E.coli* MFBF 12794 osjetljiva.

Kod ispitivane gljivične vrste *C. albicans* ATCC 10231 određena je i najmanja minimalna inhibitorna koncentracija od svih ispitanih spojeva na svim mikroorganizmima, a iznosi 37,28 µg/mL (mjerenje optičke gustoće), odnosno 32,02 µg/mL (XTT-formazan test) za spoj 6. I drugi kompleksi s galijem (osim spoja 4) pokazali su dobru aktivnost prema *C. albicans* ATCC 10231 uz MIK vrijednosti 70,47 – 198,61 µg/mL. Galijev nitrat inhibirao je

90% rasta *C. albicans* ATCC 10231 pri koncentraciji 162,6  $\mu\text{g/mL}$  (mjerjenje optičke gustoće), odnosno 160,5  $\mu\text{g/mL}$  (XTT-formazan test) što je više od spojeva 6 i 7, ali usporedivo sa spojevima 5, 11, 12 i 13. Svi određeni MIK-ovi značajno su viši od MIK-a nistatina. Spoj 6 također je dobro inhibirao rast *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 uz pripadajuće MIK vrijednosti od 64,42  $\mu\text{g/mL}$  (mjerjenje optičke gustoće) i 64,62  $\mu\text{g/mL}$  (XTT-formazan test). Spojevi 4, 5, 7, 11, 12 i 13 također su djelovali na rast *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 pri rasponu minimalnih inhibitornih koncentracija od 73,89  $\mu\text{g/mL}$  do 222,9  $\mu\text{g/mL}$ . Ovdje ponovno treba uzeti u obzir MIK galijevog nitrata koji iznosi 155,2  $\mu\text{g/mL}$  (mjerjenje optičke gustoće) tj. 152,1  $\mu\text{g/mL}$  (XTT-formazan test), a to su vrijednosti usporedive s onima kod spojeva 4, 5, 7, 11, 12 i 13 te postoji mogućnost da je antifungalno djelovanje ovih kompleksa posljedica djelovanja galija. MIK nistatina ponovno je značajno niži od svih aktivnih spojeva na *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100. Ovisnost vijabilnosti, odnosno enzimske aktivnosti *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 o logaritmu koncentracije spoja 6 prikazana je na slikama 12 i 13.



**Slika 12.** Krivulja Gompertzove nelinearne regresije za ovisnost vijabilnosti i enzimske aktivnosti *C. albicans* ATCC 10231 o logaritmu koncentracije spoja 6



Slika 13. Krivulja Gompertzovog modela nelinearne regresije za ovisnost vijabilnosti i enzimске aktivnosti *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 o logaritmu koncentracije spoja 6

#### 4.3. Ispitivanje antimikrobnog učinka u vremenu spoja 6 na *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 korištenjem „time-kill“ metode

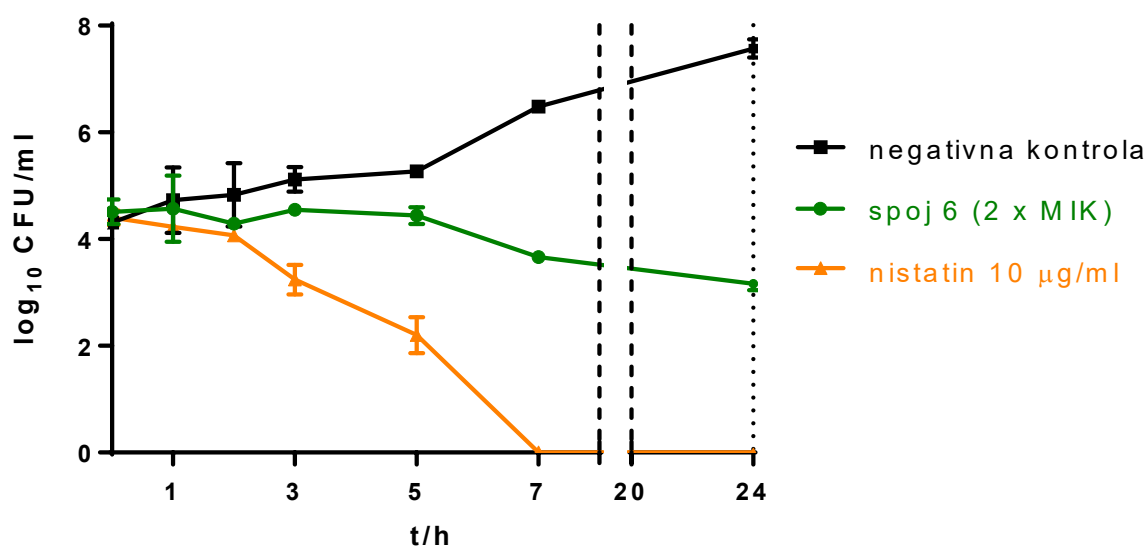
S obzirom da su kod spoja 6 eksperimentalno utvrđene najniže vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija, i to za sojeve *C. albicans* ATCC 10231 (MIK=32,02 µg/mL za detekciju XTT-formazan testom) i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 (MIK=64,62 µg/mL za detekciju XTT-formazan testom), njegov je učinak na staničnu vijabilnost tih sojeva ispitan u ovisnosti o vremenu tijekom 24 sata. Korištene su dvostruko veće koncentracije spoja 6 od eksperimentalno utvrđenih MIK vrijednosti uz pozitivnu (otopina nistatina u koncentraciji 10 µg/mL) i negativnu kontrolu (netretirane stanice). Podaci koji prikazuju broj kolonija ispitivanih sojeva (izraženih kao log<sub>10</sub> (broj kolonija/CFU mL<sup>-1</sup>)) u pojedinim vremenskim intervalima prikazani su u tablici 6, a izraženi su kao aritmetičke sredine dvaju nezavisnih eksperimenata. Grafički prikaz ovisnosti broja kolonija (log<sub>10</sub> (broj kolonija/CFU mL<sup>-1</sup>)) o vremenu (h) prikazan je na slici 14 za *C. albicans* ATCC te na slici 15 za *C. albicans*<sup>FLR+</sup>.

**Tablica 6.** Vrijednosti  $\log_{10}(\text{broj kolonija/CFU mL}^{-1})$  za sojeve *C. albicans* ATCC i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> tretirane spojem 6, pozitivnom i negativnom kontrolom u vremenu izraženom u satima

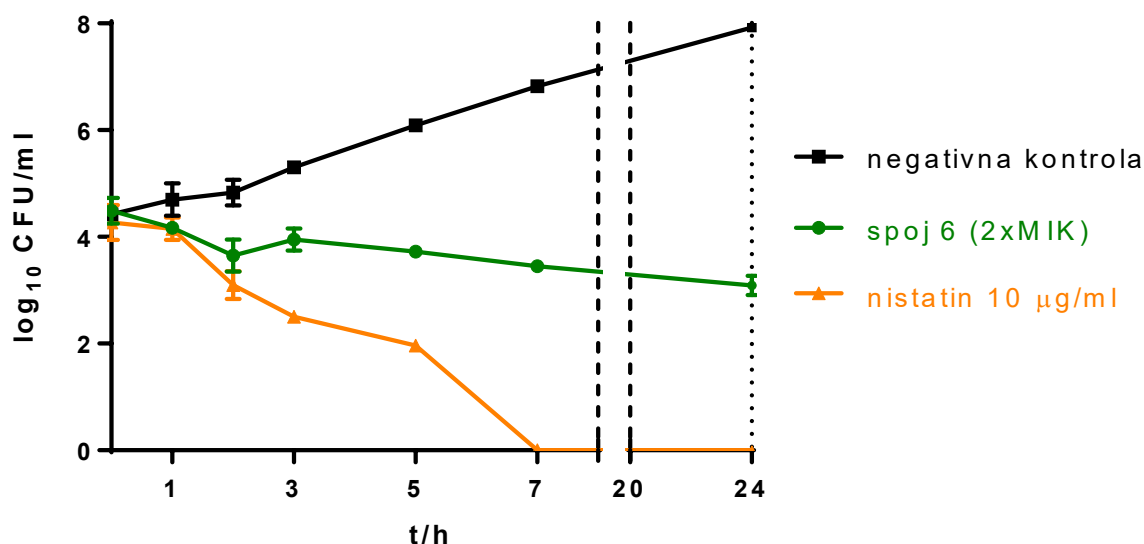
vrijeme	<i>C. albicans</i> ATCC 10231			<i>C. albicans</i> <sup>FLR+</sup> MFBF 11100		
	spoj 6 (2xMIK)	negativna kontrola	nistatin (10 $\mu\text{g/mL}$ )	spoj 6 (2xMIK)	negativna kontrola	nistatin (10 $\mu\text{g/mL}$ )
0 h	4,51	4,31	4,40	4,49	4,42	4,27
1 h	4,57	4,73	4,23	4,17	4,70	4,15
2 h	4,29	4,83	4,07	3,65	4,83	3,10
3 h	4,55	5,12	3,24	3,95	5,30	2,50
5 h	4,44	5,27	2,20	3,72	6,09	1,96
7 h	3,66	6,48	0,00	3,45	6,82	0,00
24 h	3,16	7,57	0,00	3,09	7,92	0,00

MIK = minimalna inhibitorna koncentracija (IC<sub>90</sub>) za ispitivani soj

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da ispitivani kompleks (u koncentraciji 2xMIK) pokazuje antifungalni učinak u vremenu na ispitivanim sojevima *C. albicans* u *in vitro* uvjetima, s obzirom da nije došlo do povećanja stanične vijabilnosti nakon 24-satne inkubacije kao kod negativne kontrole (netretirane stanice). Istovremeno, spoj 6 nije doveo do stopostotnog smanjenja vijabilnosti nakon 24 sata. Pozitivna kontrola izvedena s nistatinom u koncentraciji 10  $\mu\text{g/mL}$  dovela je do potpune redukcije stanične vijabilnosti obaju ispitivanih sojeva već nakon 7 sati inkubacije.



**Slika 14.** „Time-kill“ krivulje vrste *C. albicans* ATCC 10231 tretirane spojem 6 uz pozitivnu (nistatin) i negativnu kontrolu (netretirane stanice). Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine  $\pm$  standardna devijacija.



**Slika 15.** „Time-kill“ krivulje vrste *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBB 11100 tretirane spojem 6 uz pozitivnu (nistatin) i negativnu kontrolu (netretirane stanice). Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine ± standardna devijacija.

Dodatno, u tablici 7 i na slikama 16 i 17 prikazana je usporedba postotka redukcije logaritma broja kolonija *C. albicans* ATCC 10231, odnosno *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBB 11100 u uzorku za spoj 6 i nistatin u odnosu na logaritam broja mikroba pojedinog soja u t<sub>0</sub> negativne kontrole. Ispitivani kompleks nije pokazao stopostotnu redukciju ni kod jednog soja, za razliku od nistatina koji je antimikotik s dokazanim fungicidnim učinkom. Nakon 24 sata, spoj 6 doveo je do 26,80 % redukcije logaritma stanične vijabilnosti *C. albicans* ATCC i 30,12 % redukcije kod *C. albicans*<sup>FLR+</sup>. Statistički značajna razlika između postotaka redukcije spoja 6 i nistatina (Studentov t-test, α=0.05, p<0.05) postoji već nakon 3 sata inkubacije za oba ispitana soja.

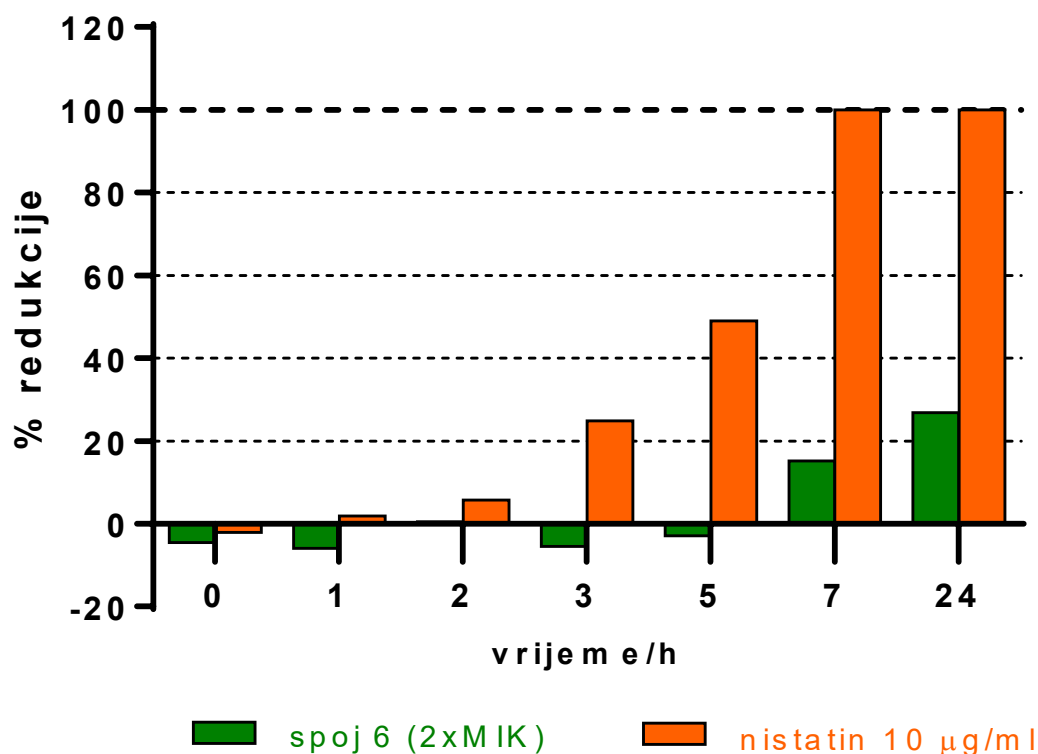
Tablica 8 prikazuje postotak redukcije logaritma broja kolonija *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBB 11100 u uzorku za spoj 6 u odnosu na logaritam broja mikroba pojedinog soja u istom tom vremenu negativne kontrole (netretirane stanice). Vidljiv je pad vijabilnosti u odnosu na negativnu kontrolu nakon 24 sata, i to 58,32% za *C. albicans* ATCC 10231 te 61,05% za *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBB 11100.

**Tablica 7.** Postotak redukcije logaritma broja kolonija *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 za spoj 6 i nistatin u odnosu na logaritam broja kolonija u t<sub>0</sub> negativne kontrole u vremenu izraženom u satima

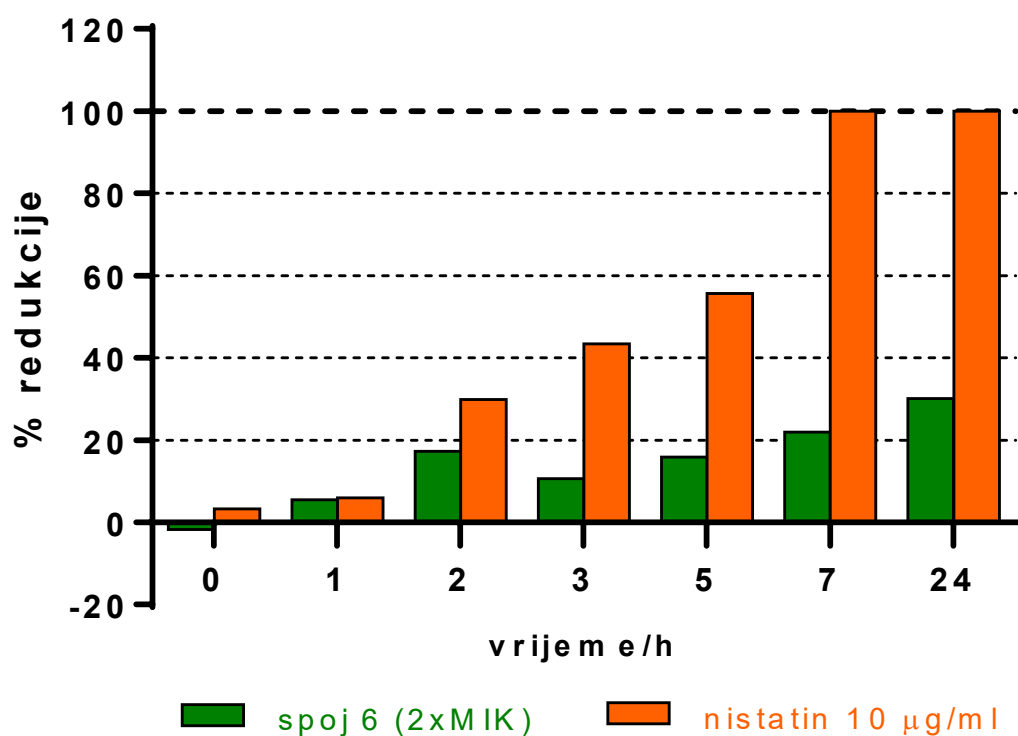
vrijeme	postotak redukcije log <sub>10</sub> (broj kolonija/CFUmL <sup>-1</sup> )			
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> <sup>FLR+</sup> MFBF 11100	
	spoj 6 (2xMIK)	nistatin (10 µg/mL)	spoj 6 (2xMIK)	nistatin (10 µg/mL)
0 h	-4,52 %	-2,09 %	-1,70 %	3,28 %
1 h	-5,92 %	1,86 %	5,55 %	6,00 %
2 h	0,46 %	5,68 %	17,33 %	29,90 %
3 h*	-5,45 %	24,83 %	10,65 %	43,37 %
5 h*	-2,90 %	48,96 %	15,86 %	55,61 %
7 h*	15,20 %	100,00 %	21,97 %	100,00 %
24 h*	26,80 %	100,00 %	30,12 %	100,00 %

MIK = minimalna inhibitorna koncentracija (IC<sub>90</sub>) za ispitivani soj

\* = statistički značajna razlika (Studentov t-test, α=0.05, p<0.05) između postotka redukcije spoja 6 i nistatina za oba ispitana soja *C. albicans*



**Slika 16.** Postotak redukcije logaritma broja kolonija *C. albicans* ATCC 10231 za spoj 6 i nistatin u odnosu na logaritam broja kolonija u t<sub>0</sub> negativne kontrole u vremenu izraženom u satima



**Slika 17.** Postotak redukcije logaritma broja kolonija *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 za spoj 6 i nistatin u odnosu na logaritam broja kolonija u t<sub>0</sub> negativne kontrole u vremenu izraženom u satima

**Tablica 8.** Postotak redukcije logaritma broja kolonija *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 za spoj 6 u odnosu na logaritam broja kolonija u istom vremenu (t<sub>x</sub>) negativne kontrole

	vrijeme						
	0 h	1 h	2 h	3 h	5 h	7 h	24 h
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-4,52 %	3,49 %	11,09 %	11,23 %	15,84 %	43,60 %	58,32 %
<i>C. albicans</i> <sup>FLR+</sup> MFBF 11100	-1,70 %	11,28 %	24,43 %	25,57 %	38,95 %	49,45 %	61,05 %

U konačnici je vidljivo da spoj 6 nakon 24-satne inkubacije ne dovodi do potpune redukcije stanične vijabilnosti ispitivanih sojeva, ali niti do porasta vijabilnosti u odnosu na početni inokulum. Iz navedenog se može zaključiti da spoj 6 posjeduje fungistatski učinak u koncentraciji 2xMIK na *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 u *in vitro* uvjetima. Nepostojanje statistički značajne razlike (Studentov t-test,  $\alpha=0.05$ ,  $p>0.05$ ) između postotka redukcije logaritma broja mikroba referentnog soja *C. albicans* ATCC i klinički rezistentnog soja *C. albicans*<sup>FLR+</sup> nakon 24 sata navodi na zaključak da je antifungalno djelovanje spoja 6 neovisno o mehanizmu rezistencije *C. albicans* na azole. Također, pad vijabilnosti u uzorku sa spojem 6 u odnosu na porast kod negativne kontrole pokazuje da ispitivani kompleks djeluje na replikaciju *Candida*, tj. blokira njihovo dijeljenje.



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju postavljenih ciljeva, provedenih istraživanja i diskusije može se izvesti nekoliko zaključaka. Od trinaest novosintetiziranih kompleksa aroilhidrazona sa željezom i galijem, samo oni s galijem pokazuju antimikrobni učinak u *in vitro* uvjetima. Nijedan od šest kompleksa aroilhidrazona sa željezom nije djelovao inhibitorno na ispitane sojeve *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* uz korištenje metoda difuzije u agaru i mikrodilucije (nisu postigli 90% inhibicije rasta u ispitanim koncentracijama). Navedeni rezultat upućuje na to da značajni dio antimikrobne aktivnosti ispitanih kompleksa potječe od galijevog(3+) iona.

Ispitivanjem mikrobiološke aktivnosti metodom difuzije u agaru utvrđeno je da spojevi 4, 5, 6, 7, 11, 12 i 13 u koncentraciji 1 mg/mL djeluju inhibitorno na rast *S. aureus* ATCC 6538 i MRSA MFBF 177 uz promjere zone inhibicije rasta između 9,33 mm i 11,67 mm. Pri tome nije zabilježena statistički značajna razlika između promjera zona inhibicije rasta pojedinog spoja na *S. aureus* ATCC 6538 i na MRSA MFBF 177 što može upućivati na to da aktivni kompleksi djeluju mehanizmom različitim od mehanizma rezistencije kliničkog izolata MRSA. Spojevi 4, 5, 6, 7 i 12 u koncentraciji 1 mg/mL djelovali su inhibitorno na rast *E. coli* ATCC 10536, a izmjereni promjeri zona inhibicije rasta iznosili su između 11,67 mm i 19,33 mm. Isti spojevi u istoj koncentraciji djelovali su inhibitorno i na ESBL+ *E. coli* MFBF 12794 uz promjere zona inhibicije rasta 10,00 – 11,33 mm, a za spojeve 4, 5, 6 i 7 ti su promjeri statistički značajno manji od onih za *E. coli* ATCC 10536. Spojevi 6 i 7 u koncentraciji 1 mg/mL inhibirali su porast *C. albicans* ATCC 10231 s promjerima zone inhibicije rasta od 12,67 mm i 10,67 mm. Samo spoj 6 (koncentracija 1 mg/mL) pokazao je inhibiciju rasta *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 uz promjer zone inhibicije rasta od 12,33 mm.

Metodom mikrodilucije određene su IC<sub>50</sub> i IC<sub>90</sub> (MIK) vrijednosti spojeva 1 – 13. Najbolju aktivnost na *S. aureus* ATCC 6538 pokazao je spoj 7 koji je inhibirao 90% porasta pri koncentraciji 97,95 µg/mL. Isti spoj ima i najnižu MIK vrijednost za MRSA MFBF 177, a ona iznosi 109,1 µg/mL. Za *E. coli* ATCC 10536 najniža minimalna inhibitorna koncentracija utvrđena je za spoj 5 (59,60 µg/mL) koji je također najbolje inhibirao rast i ESBL+ *E. coli* MFBF 12794 (111,2 µg/mL). Spoj 6 ima najniže MIK vrijednosti za *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 od svih ispitanih spojeva, a one iznose 32,02 µg/mL, odnosno 64,62 µg/mL. Navedeni rezultati odnose se na detekciju TTC-formazanskim i XTT-formazanskim testom. Važno je napomenuti da su MIK-ovi spojeva s najboljim djelovanjem na pojedini soj niži od MIK vrijednosti galijevog nitrata za isti soj, ali i značajno viši od

pozitivnih kontrola s antimikrobnim lijekovima. Iz ovoga se može zaključiti da kompleksi aroilhidrazona i galija pokazuju bolji antimikrobni učinak od samog galija (u obliku galijevog nitrata) u *in vitro* uvjetima, i to u nižim masenim koncentracijama.

Ispitivanje antifungalnog učinka u vremenu spoja 6 na sojevima *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 u *in vitro* uvjetima pokazalo je da ispitivani kompleks u koncentraciji 2xMIK posjeduje fungistatski učinak tijekom 24 sata. Spoj 6 doveo je do 26,80% redukcije logaritma stanične vijabilnosti *C. albicans* ATCC i 30,12 % redukcije kod *C. albicans*<sup>FLR+</sup> nakon 24 sata inkubacije, za razliku od pozitivne kontrole nistatina (koncentracija 10 µg/mL) koji je već nakon 7 sati u potpunosti reducirao staničnu vijabilnost ispitivanih sojeva. Također, nepostojanje statistički značajne razlike između postotka redukcije logaritma broja mikroba referentnog soja *C. albicans* ATCC i klinički rezistentnog soja *C. albicans*<sup>FLR+</sup> nakon 24 sata navodi na zaključak da je antifungalno djelovanje spoja 6 neovisno o mehanizmu rezistencije *C. albicans* na azole. Pad vijabilnosti u uzorku sa spojem 6 u odnosu na porast kod netretiranih stanica pokazuje da ispitivani kompleks djeluje na replikaciju *Candida*, tj. blokira njihovo dijeljenje.

Potrebna su daljnja ispitivanja kako bi se utvrdio točan mehanizam antimikrobnog djelovanja kompleksa aroilhidrazona s galijem kao i potencijal za razvoj sličnih spojeva s boljim biološkim učincima.

## 6. LITERATURA

1. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, 2000, 275, 19906–19912.
2. Abdel-Aal MT, El-Sayed WA, El-Ashry EH. Synthesis and antiviral evaluation of some sugar arylglycinoylhydrazones and their oxadiazoline derivatives. *Arch Pharm Chem Life Sci*, 2006, 339, 656-663.
3. Ainscough EW, Brodie AM, Denny WA, Finlay GJ, Gothe SA, Ranford JD. Cytotoxicity of salicylaldehyde benzoylhydrazone analogs and their transition metal complexes: Quantitative structure-activity relationships. *J Inorg Biochem*, 1999, 77(3-4), 125-33.
4. Andrews S, Norton I, Salunkhe AS, Goodluck H, Aly WS, Mourad-Agha H, Cornelis P. Control of iron metabolism in bacteria. *Metal Ions Life Sci*, 2013, 12, 203–239.
5. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron Homeostasis. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69, 69–85.
6. Antunes LCS, Imperi F, Minandri F, Visca P. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(11), 5961-5970.
7. Apseloff G, Hackshaw KV, Whitacre C, Weisbrode SE, Gerber N. Gallium nitrate suppresses lupus in MRL/lpr mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1997, 356, 517-525.
8. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antifungal Susceptibility Testing. EUCAST Definitive Document E.Def. 7.3.2. (2020.) Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. [Online]. Dostupno na: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Files/EUCAEU\\_E\\_Def\\_7.3.2\\_Yeast\\_testing\\_definitive\\_revised\\_2020.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAEU_E_Def_7.3.2_Yeast_testing_definitive_revised_2020.pdf), pristupljeno 17. 08. 2020.

9. Arnold CE, Bordin A, Lawhon SD, Libal MC, Bernstein LR, Cohen ND. Antimicrobial activity of gallium maltolate against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*: An *in vitro* study. *Vet Microbiol*, 2012, 155, 389–394.
10. Backes GL, Neumann DM, Jursic BS. Synthesis and antifungal activity of substituted salicylaldehyde hydrazones, hydrazides and sulfohydrazides. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(17), 4629-4636.
11. Bairwaa G, Jung WH, Kronstada JW. Iron acquisition in fungal pathogens of humans. *Metallomics*, 2017, 9(3), 215–227.
12. Ballouche M, Cornelis P, Baysse C. Iron Metabolism: A promising target for antibacterial strategies. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2009, 4(3), 190-205.
13. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi I, Ibsouda S. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*, 2016, 6(2), 71-79.
14. Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3), 2064-2069.
15. Bastos RW, Rossato L, Valero C, Lagrou K, Colombo AL, Goldman GH. Potential of gallium as an antifungal agent. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9, 414.
16. Bastos T de O, Soares BM, Cisalpino PS, Mendes IC, dos Santos RG, Beraldo H. Coordination to gallium(III) strongly enhances the potency of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones against *Cryptococcus* opportunistic fungi. *Microbiol Res*, 2010, 165(7), 573-577.
17. Baysse C, De Vos D, Naudet Y, Vandermonde A, Ochsner U, Meyer JM, Budzikiewicz H, Schäfer M, Fuchs R, Cornelis P. Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2000, 146(10), 2425-2434.

18. Bendova P, Mackova E, Haskova P, Vavrova A, Jirkovsky E, Sterba M, Popelova O, Kalinowski DS, Kovarikova P, Vavrova K, Richardson DR, Simunek T. Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidative stress-induced cellular injury. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23, 1105–1114.
19. Benković T, Kontrec D, Kazazić S, Chiš V, Miljanić S, Galić N. Diverse coordination of aroylhydrazones toward iron(III) in solid state and in solution: spectrometric, spectroscopic and computational study. *Mol Divers*, 2019.
20. Bernstein LR. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol Rev*, 1998, 50, 665-682.
21. Bockman R. The effects of gallium nitrate on bone resorption. *Semin Oncol*, 2003, 30, 5-12.
22. Braun V, Pramanik A, Gwinner T, Koberle M, Bohn E. Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals*, 2009, 22(1), 3-13.
23. Brena S, Cabezas-Olcoz J, Moragues MD, Fernández de Larrinoa I, Domínguez A, Quindós G, Pontón J. Fungicidal monoclonal antibody C7 interferes with iron acquisition in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(7), 3156-3163.
24. Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo-transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals*, 2006, 19(2), 143-157.
25. Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(5), 509–519.
26. Chitambar CR. Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(8), 2044-2053.
27. Chitambar CR. Medical applications and toxicities of gallium compounds. *Int J Environ Res Public Health*, 2010, 7, 2337-2361.

28. Chitambar CR, Narasimhan J. Targeting iron-dependent DNA synthesis with gallium and transferrin-gallium. *Pathobiology*, 1991, 59(1), 3-10.
29. Chitambar CR, Seligman PA. Effects of different transferrin forms on transferrin receptor expression, iron uptake and cellular proliferation of human leukemic HL60 cells: Mechanisms responsible for the specific cytotoxicity of transferrin-gallium. *J Clin Invest*, 1986, 78, 1538-1546.
30. Chitambar CR, Živković Z. Uptake of gallium-67 by human leukemic cells: Demonstration of transferrin receptor-dependent and transferrin-independent mechanisms. *Cancer Res*, 1987, 47, 3929-3934.
31. Choby JE, Skaar EP. Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens. *J Mol Biol*, 2016, 428(17), 3408–3428.
32. Coelho TS, Cantos JB, Bispo MLF, Gonçalves RSB, Lima CHS, da Silva PEA, Souza MVN. *In vitro* anti-mycobacterial activity of (E)-N'-(monosubstituted-benzylidene) isonicotinohydrazide derivatives against isoniazid-resistant strains. *Infect Dis Rep*, 2012, 4(13), 49-51.
33. Coughlan MP. The role of iron in microbial metabolism. *Sci Prog*, 1971, 59, 1-23.
34. Cvitkovic F, Armand JP, Tubiana-Hulin M, Rossi JF, Warrell RP Jr. Randomized, double-blind, phase II trial of gallium nitrate compared with pamidronate for acute control of cancer-related hypercalcemia. *Cancer J*, 2006, 12, 47-53.
35. da Silva JG, Azzolini LS, Wardell SMSV, Wardell JL, Beraldo H. Increasing the antibacterial activity of gallium(III) against *Pseudomonas aeruginosa* upon coordination to pyridine-derived thiosemicarbazones. *Polyhedron*, 2009, 28, 2301-2305.
36. Dayagi S, Degani Y. Methods of formation of the carbon-nitrogen double bond. U: The chemistry of the carbon-nitrogen double bonds. Patai S, urednik, New York, Wiley, 1970, str. 61-74.

37. Del Campo JSM, Vogelaar N, Tolani K, Kizjakina K, Harich K, Sobrado P. Inhibition of the flavin-dependent monooxygenase siderophore A (SidA) blocks siderophore biosynthesis and *Aspergillus fumigatus* growth. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(11), 3035-3042.
38. DeLeon K, Balldin F, Watters C, Hamood A, Griswold J, Sreedharan S, Rumbaugh KP. Gallium maltolate treatment eradicates *Pseudomonas aeruginosa* infection in thermally injured mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, 1331-1337.
39. Drakesmith H, Prentice AM. Heparin and the iron-infection axis. *Science*, 2012, 338, 768–772.
40. Edwards CL, Hayes RL. Tumor scanning with <sup>67</sup>Ga citrate. *J Nucl Med*, 1969, 10, 103-105.
41. Emery T. Exchange of iron by gallium in siderophores. *Biochemistry*, 1986, 25, 4629-4633.
42. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Discussion Document E.Dis 5.1. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect*, 2003, 9, 1-7.
43. Ferreras JA, Ryu JS, Di Lello F, Tan DS, Quadri LE. Small molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(1), 29-32.
44. Frangipani E, Bonchi C, Minandri F, Imperi F, Visca P. Pyochelin potentiates the inhibitory activity of gallium on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58, 5572-5575.
45. Furci LM, Lopes P, Eakanunkul S, Zhong S, MacKerell AD Jr, Wilks A. Inhibition of the bacterial heme oxygenases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis*: Novel antimicrobial targets. *J Med Chem*, 2007, 50(16), 3804-3813.

46. Galić N, Dijanošić A, Kontrec D, Miljanić S. Structural investigation of aroylhydrazones in dimethylsulphoxide/water mixtures. *Spectrochim Acta A*, 2012, 95, 347-353.
47. Gallium | Ga – PubChem, National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 5360835, Gallium, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallium>, pristupljeno 26. 8. 2020.
48. García-Contreras R, Lira-Silva E, Jasso-Chávez R, Hernández-González IL, Maeda T, Hashimoto T, Boogerd FC, Sheng L, Wood TK, Moreno-Sánchez R. Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303(8), 574-582.
49. Goldner W. Cancer-Related Hypercalcemia. *J Oncol Pract*, 2016, 12(5), 426-432.
50. Govindasami T, Pandey A, Palanivelu N, Pandey A. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biologically important vanillin related hydrazone derivatives. *Int J Org Chem*, 2011, 1, 71-77.
51. Haas H, Eisendle M, Turgeon BG. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol*, 2008, 46, 149-87.
52. Habeshaw JA, Lister TA, Stansfeld AG. Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 1983, 1, 498-501.
53. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine 5<sup>th</sup> ed. Oxford, Oxford University Press, 2015, str. 199-201.
54. Hart MM, Adamson RH. Antitumor activity and toxicity of salts of inorganic group IIIa metals: aluminum, gallium, indium and thallium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68, 1623-1626.



55. Hijazi S, Visaggio D, Pirolo M, Frangipani E, Bernstein L, Visca P. Antimicrobial activity of gallium compounds on ESKAPE pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8, 316.
56. Horackova M, Ponka P, Byczko Z. The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2000, 47, 529–536.
57. Hruskova K, Kovarikova P, Bendova P, Haskova P, Mackova E, Stariat J, Vavrova A, Vavrova K, Simunek T. Synthesis and initial *in vitro* evaluations of novel antioxidant aroylhydrazone iron chelators with increased stability against plasma hydrolysis. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24, 290–302.
58. Huber P, Leuenberger H, Keller-Schierlein W. Danoxamine, the iron-binding moiety of the sideromycin antibiotic danomycin. *Helv Chim Acta*, 1986, 69, 236-245.
59. Iliev I, Kontrec D, Detcheva R, Georgieva M, Balacheva A, Galić N, Pajpanova T. Cancer cell growth inhibition by aroylhydrazone derivatives. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2019, 33(1), 756-763.
60. Jansová H, Kubeš J, Reimerová P, Štěrbová-Kovaříková P, Roh J, Šimůnek T. 2,6-dihydroxybenzaldehyde analogues of the iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: Increased hydrolytic stability and cytoprotective activity against oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 2018, 31(11), 1151-1163.
61. Johnson DK, Murphy TB, Rose NJ, Goodwin WH, Pickart L. Cytotoxic chelators and chelates 1. Inhibition of DNA synthesis in cultured rodent and human cells by aroylhydrazones and by a copper(II) complex of salicylaldehyde benzoyl hydrazone. *Inorg Chim Acta*, 1982, 67, 159–165.
62. Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(4), 547-583.
63. Kaneko Y, Thoendel M, Olakanmi O, Britigan BE, Singh PK. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and

antibiofilm activity. *J Clin Invest*, 2007, 117, 877–888.

64. Kelson AB, Carnevali M, Truong-Le V. Gallium-based anti-infectives: Targeting microbial iron-uptake mechanisms. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(5), 707-716.
65. King SC, Reiman RJ, Prosnitz LR. Prognostic importance of restaging gallium scans following induction chemotherapy for advanced Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*, 1994, 12, 306-311.
66. Kochan I. The role of iron in bacterial infections, with special consideration of host-tubercle bacillus interaction. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1973, 60, 1-30.
67. Kömürcü, ŞG, Rollas S, Ülgen M, Gorrod JW, Çevikbaş A. Evaluation of some arylhydrazones of p-aminobenzoic acid hydrazide as antimicrobial agents and their *in vitro* hepatic microsomal metabolism. *Boll Chim Farm*, 1995, 134, 375-379.
68. Kosman, DJ. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol*, 2003, 47, 1185–1197.
69. Kovaříková P, Mrkvičková Z, Klimeš J. Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47, 360–370.
70. Kragl C, Schrettl M, Abt B, Sarg B, Lindner HH, Haas H. EstB-mediated hydrolysis of the siderophore triacetylfusarinine C optimizes iron uptake of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 2007, 6(8),1278-1285.
71. Lessa JA, Parrilha GL, Beraldo H. Gallium complexes as new promising metallodrug candidates. *Inorg Chim Acta*, 2012, 393, 53–63.
72. Masson PL, Heremans JF, Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med*, 1969, 130, 643–658.

73. Matković V, Balboa A, Clinchot D, Whitacre C, Zwilling B, Brown D, Weisbrode SE, Apseloff G, Gerber N. Gallium prevents adjuvant arthritis in rats and interferes with macrophage/T-cell function in the immune response. *Curr Ther Res*, 1991, 50, 255-267.
74. Messenger AJM, Barclay R. Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochem Educ*, 1983, 11(2) 54-63.
75. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(3), 413-451.
76. Minandri F, Bonchi C, Frangipani E, Imperi F, Visca P. Promises and failures of gallium as an antibacterial agent. *Future Microbiol*, 2014, 9(3), 379–397.
77. Moldovan C, Oniga O, Meda R, Tiperciuc B, Verite P, Pîrnău A, Crișan O, Bojiță M. Synthesis and antimicrobial screening of novel 2,3 or 4-[2-aryl-thiazol-yl-methoxy (oxo-ethoxy)]-benzaldehyde isonicotinoyl hydrazide analogs. *Farmacia*, 2011, 59(5), 659–668.
78. Moreau-Marquis S, Bomberger JM, Anderson GG, Swiatecka-Urban A, Ye S, O'Toole GA, Stanton BA. The DeltaF508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(1), 25-37.
79. Nairz M, Schroll A, Sonnweber T, Weiss G. The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cell Microbiol*, 2010, 12,1691–1702.
80. Narasimhan J, Antholine WE, Chitambar CR. Effect of gallium on the tyrosyl radical of the iron-dependent M2 subunit of ribonucleotide reductase. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44, 2403-2408.
81. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, McVey Ward D, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 2004, 306, 2090-2093.

82. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Heparin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis*, 2002, 29, 327-335.
83. Niewerth M, Kunze D, Seibold M, Schaller M, Korting HC, Hube B. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins and drug resistance factors. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47, 1805–1817.
84. Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Ivanov D. Synthesis and physicochemical characterization of new salicylaldehyde benzoyl hydrazone derivative with high cytotoxic activity. *Pharmacia*, 2011, 58, 4–44.
85. Olakanmi O, Kesavalu B, Pasula R, Abdalla MY, Schlesinger LS, Britigan BE. Gallium nitrate is efficacious in murine models of tuberculosis and inhibits key bacterial Fe-dependent enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(12), 6074-6080.
86. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson RS, Nizet V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*, 2006, 107, 3727–3732.
87. Polović S, Ljoljić Bilić V, Budimir A, Kontrec D, Galić N, Kosalec I. Antimicrobial assesment of aroylhydrazone derivatives in vitro. *Acta Pharmaceutica*, 2019, 69(2), 277-285.
88. Popiołek Ł. Hydrazide–hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Med Chem Res*, 2017, 26, 287–301.
89. Porcaro F, Bonchi C, Ugolini A, Frangipani E, Polzonetti G, Visca P, Meneghini C, Battocchio C. Understanding the biomimetic properties of gallium in *Pseudomonas aeruginosa*: an XAS and XPS study. *Dalton Trans*, 2017, 46, 7082-7091.
90. Pramanik A, Strocher UH, Krejci J, Standish AJ, Bohn E, Paton JC, Autenrieth IB, Braun V. Albomycin is an effective antibiotic, as exemplified with *Yersinia enterocolitica* and

*Streptococcus pneumoniae*. *Int J Med Microbiol*, 2007, 297(6), 459-469.

91. Pro B, Bociek RG, Chitambar CR, Gregory SA, Leonard JP, Smith S, Novick S. Phase 2 multicenter trial of gallium nitrate in patients with advanced non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Blood*, 2004, 104(11), 2487.
92. Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D, Philpott CC. Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2001, 276(52), 49244-49250.
93. Richards TS, Oliver BG, White TC. Micafungin activity against *Candida albicans* with diverse azole resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(2), 349-355.
94. Riedel S, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, Sakanari JA, Hotez P, Mejia R. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology 28<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill Education, 2019, str. 74.
95. Rodriguez GM, Smith I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Mol Microbiol*, 2003, 47(6), 1485-94.
96. Rollas S, Küçükgülzel ŞG. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*, 2007, 12, 1910-1939.
97. Roosenberg JM, Lin YM, Lu Y, Miller MJ. Studies and synthesis of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents. *Curr Med Chem*, 2000, 7(2), 159-197.
98. Rzhapishevskaya O, Ekstrand-Hammarström B, Popp M, Björn E, Bucht A, Sjöstedt A, Antti H, Ramstedt M. The antibacterial activity of Ga<sup>3+</sup> is influenced by ligand complexation as well as the bacterial carbon source. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(12), 5568–5580.
99. Rzhapishevskaya O, Hakobyan S, Ekstrand-Hammarström B, Nygren Y, Karlsson T, Bucht A, Elofsson M, Boily JF, Ramstedt M. The gallium(III)-salicylidene acylhydrazide

complex shows synergistic anti-biofilm effect and inhibits toxin production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Inorg Biochem*, 2014, 138, 1-8.

100. Sheldon JR, Heinrichs DE. Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, 39(4), 592-630.
101. Simunek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Sterba M, Gersl V, Hrdina R, Ponka P, de Lange JJ, Paulus WJ, Musters RJ. SIH: a novel lipophilic iron chelator-- protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39, 345–354.
102. Smith NW, Strutton GM, Walsh MD, Wright GR, Seymour GJ, Lavin MF, Gardiner RA. Transferrin receptor expression in primary superficial human bladder tumours identifies patients who develop recurrences. *Br J Urol*, 1990, 65, 339-344.
103. Stefanska AL, Fulston M, Houge-Frydrych CS, Jones JJ, Warr SR. A potent seryl tRNA synthetase inhibitor SB-217452 isolated from a *Streptomyces* species. *J Antibiot (Tokyo)*, 2000, 53(12), 1346-1353.
104. Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, Adamcova M, Guncova I, Kaiserova H, Palicka V, Ponka P, Gersl V. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology*, 2007, 235, 150–166.
105. Stojiljkovic I, Kumar V, Srinivasan N. Non-iron metalloporphyrins: Potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria. *Mol Microbiol*, 1999, 31(2), 429-442.
106. Tchekalarova J, Angelova VT, Todorova N, Andreeva-Gateva P, Rangelov M. Evaluation of the anticonvulsant effect of novel melatonin derivatives in the intravenous pentylenetetrazol seizure test in mice. *Eur J Pharmacol*, 2019, 863, 172684.

107. Tong Y, Guo M. Bacterial heme-transport proteins and their hemecoordination modes. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 481(1), 1-15.
108. Turkova J, Mikes O, Sorum F. Determination of the structure of the peptide moiety of the antibiotic albomycin. *Experientia*, 1963, 19, 633-634.
109. Ülgen M, Durgun BB, Rollas, S, Gorrod JW. The *in vitro* hepatic microsomal metabolism of benzoic acid benzylidenehydrazide. *Drug Metab Interact*, 1997, 13, 285-294.
110. Vallabhajosula SR, Harwig JF, Wolf W. The mechanism of tumor localization of gallium-67 citrate: Role of transferrin binding and effect of tumor pH. *Int J Nucl Med Biol*, 1981, 8, 363-370.
111. Verma G, Marella A, Shaquiuzzaman M, Akhtar M, Ali MR, Alam MM. A review exploring biological activities of hydrazones. *J Pharm Bioall Sci*, 2014, 6, 69-80.
112. Vertesy L, Aretz W, Fehlhaber HW, Kogler H, Salmycin A-D. Salmycin A–D, antibiotics from *Streptomyces violaceus*, DSM 8286, having a siderophore-aminoglycoside structure. *Helv Chim Acta*, 1995, 78, 46-60.
113. Vicini P, Incerti M, Doytchinova I, La Colla P, Busonera B, Loddo R. Synthesis and antiproliferative activity of benzo[d]isothiazole hydrazones. *Eur J Med Chem*, 2006, 41, 624-632.
114. Walcourt A, Kurantsin-Mills J, Kwagyan J, Adenuga BB, Kalinowski DS, Lovejoy DB, Lane DJR, Richardson DR. Anti-plasmodial activity of aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators: Effect on erythrocyte membrane integrity, parasite development and the intracellular labile iron pool. *J Inorg Biochem*, 2013, 129, 43-51.

115. Walcourt A, Loyevsky M, Lovejoy DB, Gordeuk VR, Richardson DR. Novel aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and -sensitive parasites. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36, 401-407.
116. Warrell RP Jr, Coonley CJ, Straus DJ, Young CW. Treatment of patients with advanced malignant lymphoma using gallium nitrate administered as a seven-day continuous infusion. *Cancer*, 1983, 51, 1982-1987.
117. Warrell RP Jr, Murphy WK, Schulman P, O'Dwyer PJ, Heller G. A randomized double-blind study of gallium nitrate compared with etidronate for acute control of cancer-related hypercalcemia. *J Clin Oncol*, 1991, 9, 1467-1475.
118. Weick JK, Stephens RL, Baker LH, Jones SE. Gallium nitrate in malignant lymphoma: A Southwest Oncology Group study. *Cancer Treat Rep*, 1983, 67, 823-825.
119. Weinberg, ED. Biosynthesis of secondary metabolites: Roles of trace metals. *Adv Microb Physiol*, 1969, 4, 1-44.
120. Weiss G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005, 18(2), 183–201.
121. Whitacre C, Apseloff G, Cox K, Matković V, Jewell S, Gerber N. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by gallium nitrate. *J Neuroimmunol*, 1992, 39, 175-181.
122. Wittmann S, Schnabelrauch M, Scherlitz-Hofmann I, Möllmann U, Ankel-Fuchs D, Heinisch L. New synthetic siderophores and their beta-lactam conjugates based on diamino acids and dipeptides. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10(6), 1659-1670.
123. Xu Z, Zhao X, Chen X, Chena Z, Xia Z. Antimicrobial effect of gallium nitrate against bacteria encountered in burn wound infections. *RSC Adv*, 2017, 7, 52266-52273.



124. Zhanel GG, Golden AR, Zelenitsky S, Wiebe K, Lawrence CK, Adam HJ, Idowu T, Domalaon R, Schweizer F, Zhanel MA, Lagacé-Wiens PRS, Walkty AJ, Noreddin A, Lynch Iii JP, Karlowsky JA. Cefiderocol: A siderophore cephalosporin with activity against carbapenem-resistant and multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Drugs*, 2019, 79(3), 271-289.
125. Zorić N, Horvat I, Kopjar N, Vučemilović A, Kremer D, Tomić S, Kosalec I. Hydroxytyrosol expresses antifungal activity *in vitro*. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(9), 992-998.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

Mikrobni metabolizam željeza predstavlja dobru metu za antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Metal galij zbog svojih sličnosti sa željezom i nemogućnosti bioloških sustava da ih razlikuju potencijalni je inhibitor metaboličkih puteva ovisnih o željezu. Koncept „trojanskog konja“ podrazumijeva upotrebu antimikrobnih tvari koje mikroorganizmi smatraju izvorima željeza te ih aktivno unose u stanicu. Primjeri takvih spojeva su hidrazoni i aroilhidrazoni, tvari s poznatim antimikrobnim učincima koje su ujedno i kelatori željeza, odnosno galija. Kompleksi hidrazona i galija stabilniji su i bolje bioraspoloživosti od samog galija, a ujedno predstavljaju kombinaciju dviju tvari s poznatim antimikrobnim učinkom u jednom spoju. Od trinaest novosintetiziranih kompleksa aroilhidrazona (izvedenih iz salicilaldehida i hidrazida nikotinske kiseline) sa željezom i galijem, metodom difuzije u agaru ustanovljeno je da samo kompleksi s galijem pokazuju antimikrobni učinak u *in vitro* uvjetima na ispitanim sojevima *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*. Metodom mikrodilucije određene su IC<sub>50</sub> i IC<sub>90</sub> (MIK) vrijednosti spojeva 1 – 13. Najbolju aktivnost pokazuju spoj 5 (MIK iznosi 59,60 µg/mL za *E. coli* ATCC 10536 i 111,2 µg/mL za ESBL+ *E. coli* MFBF 12794), spoj 6 (MIK iznosi 32,02 µg/mL za *C. albicans* ATCC 10231 i 64,62 µg/mL za *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100) i spoj 7 (MIK iznosi 97,95 µg/mL za *S. aureus* ATCC 6538 i 109,1 µg/mL za MRSA MFBF 177). „Time-kill“ metodom utvrđeno je da spoj 6 pokazuje fungistatski učinak u koncentraciji 2xMIK tijekom 24 sata na sojevima *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 u *in vitro* uvjetima. Isti kompleks doveo je do 26,80% redukcije logaritma stanične vijabilnosti *C. albicans* ATCC, odnosno 30,12 % redukcije kod *C. albicans*<sup>FLR+</sup> nakon 24 sata inkubacije.

Iron metabolism of microorganisms represents a good target for antibacterial and antifungal treatment. Because of its similarities with iron and disability of biological systems to differentiate them, metal gallium is a potential inhibitor of iron-dependent metabolic pathways. A „Trojan Horse“ concept implies using antimicrobial agents which microorganisms consider as iron source and they actively transport them inside a cell. Example of such compounds are hydrazones and aroylhydrazones, substances with known antimicrobial activity and ability to chelate iron and gallium. Gallium and hydrazone complexes are more stable and more bioavailable than gallium itself. At the same time, they represent a combination of two substances with known antimicrobial activity in one compound. Of thirteen newly synthesized aroylhydrazone complexes (derived from salicylaldehyde and nicotinic acid hydrazide) with iron and gallium, only gallium complexes showed *in vitro* antimicrobial activity on tested *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* strains when using agar-well diffusion method. IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> (MIC) values were determined with broth dilution for compounds 1 – 13. Compound 5 (MIC equals 59,60 µg/mL for *E. coli* ATCC 10536 and 111,2 µg/mL for ESBL+ *E. coli* MFBF 12794), compound 6 (MIC equals 32,02 µg/mL for *C. albicans* ATCC 10231 and 64,62 µg/mL for *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100) and compound 7 (MIC equals 97,95 µg/mL for *S. aureus* ATCC 6538 and 109,1 µg/mL for MRSA MFBF 177) showed the best activity. „Time-kill“ assay showed that compound 6 expresses fungistatic activity at 2xMIC concentration during 24 hours on *C. albicans* ATCC 10231 and *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 strains *in vitro*. Same complex reduced the logarithm of *C. albicans* ATCC cellular viability by 26,80% and *C. albicans*<sup>FLR+</sup> viability by 30,12% after 24 hours incubation.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za mikrobiologiju  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Antimikrobni učinak željezovih i galijevih kompleksa aroilhidrazona u *in vitro* uvjetima

**Dražen Lež**

### SAŽETAK

Mikrobni metabolizam željeza predstavlja dobru metu za antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Metal galij zbog svojih sličnosti sa željezom i nemogućnosti bioloških sustava da ih razlikuju potencijalni je inhibitor metaboličkih puteva ovisnih o željezu. Koncept „trojanskog konja“ podrazumijeva upotrebu antimikrobnih tvari koje mikroorganizmi smatraju izvorima željeza te ih aktivno unose u stanicu. Primjeri takvih spojeva su hidrazoni i aroilhidrazoni, tvari s poznatim antimikrobnim učincima koje su ujedno i kelatori željeza, odnosno galija. Kompleksi hidrazona i galija stabilniji su i bolje biorasploživosti od samog galija, a ujedno predstavljaju kombinaciju dviju tvari s poznatim antimikrobnim učinkom u jednom spoju. Od trinaest novosintetiziranih kompleksa aroilhidrazona (izvedenih iz salicilaldehida i hidrazida nikotinske kiseline) sa željezom i galijem, metodom difuzije u agaru ustanovljeno je da samo kompleksi s galijem pokazuju antimikrobni učinak u *in vitro* uvjetima na ispitanim sojevima *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*. Metodom mikrodilucije određene su IC<sub>50</sub> i IC<sub>90</sub> (MIK) vrijednosti spojeva 1 – 13. Najbolju aktivnost pokazuju spoj 5 (MIK iznosi 59,60 µg/mL za *E. coli* ATCC 10536 i 111,2 µg/mL za ESBL+ *E. coli* MFBF 12794), spoj 6 (MIK iznosi 32,02 µg/mL za *C. albicans* ATCC 10231 i 64,62 µg/mL za *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100) i spoj 7 (MIK iznosi 97,95 µg/mL za *S. aureus* ATCC 6538 i 109,1 µg/mL za MRSA MFBF 177). „Time-kill“ metodom utvrđeno je da spoj 6 pokazuje fungistatski učinak u koncentraciji 2xMIK tijekom 24 sata na sojevima *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 u *in vitro* uvjetima. Isti kompleks doveo je do 26,80% redukcije logaritma stanične vijabilnosti *C. albicans* ATCC, odnosno 30,12 % redukcije kod *C. albicans*<sup>FLR+</sup> nakon 24 sata inkubacije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 64 stranice, 17 grafičkih prikaza, 8 tablica i 125 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: aroilhidrazoni, željezo, galij, kompleksi, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*

Mentor: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ana Budimir**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Microbiology  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### *In vitro* antimicrobial activity of aroylhydrazone complexes with iron and gallium

**Dražen Lež**

#### SUMMARY

Iron metabolism of microorganisms represents a good target for antibacterial and antifungal treatment. Because of its similarities with iron and disability of biological systems to differentiate them, metal gallium is a potential inhibitor of iron-dependent metabolic pathways. A „Trojan Horse“ concept implies using antimicrobial agents which microorganisms consider as iron source and they actively transport them inside a cell. Example of such compounds are hydrazones and aroylhydrazones, substances with known antimicrobial activity and ability to chelate iron and gallium. Gallium and hydrazone complexes are more stable and more bioavailable than gallium itself. At the same time, they represent a combination of two substances with known antimicrobial activity in one compound. Of thirteen newly synthesized aroylhydrazone complexes (derived from salicylaldehyde and nicotinic acid hydrazide) with iron and gallium, only gallium complexes showed *in vitro* antimicrobial activity on tested *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* strains when using agar-well diffusion method. IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> (MIC) values were determined with broth dilution for compounds 1 – 13. Compound 5 (MIC equals 59,60 µg/mL for *E. coli* ATCC 10536 and 111,2 µg/mL for ESBL+ *E. coli* MFBF 12794), compound 6 (MIC equals 32,02 µg/mL for *C. albicans* ATCC 10231 and 64,62 µg/mL for *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100) and compound 7 (MIC equals 97,95 µg/mL for *S. aureus* ATCC 6538 and 109,1 µg/mL for MRSA MFBF 177) showed the best activity. „Time-kill“ assay showed that compound 6 expresses fungistatic activity at 2xMIC concentration during 24 hours on *C. albicans* ATCC 10231 and *C. albicans*<sup>FLR+</sup> MFBF 11100 strains *in vitro*. Same complex reduced the logarithm of *C. albicans* ATCC cellular viability by 26,80% and *C. albicans*<sup>FLR+</sup> viability by 30,12% after 24 hours incubation.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 64 pages, 17 figures, 8 tables and 125 references. Original is in Croatian language.

Keywords: aroylhydrazones, iron, gallium, complexes, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*

Mentor: **Ivan Kosalec, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Kosalec, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Budimir, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2010.

