

# Određivanje antibakterijske aktivnosti derivata itakonske kiseline

---

**Kučica, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:344523>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marina Kučica

Određivanje antibakterijske aktivnosti derivata itakonske kiseline

## DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020. godina

Ovaj je diplomski rad prijavljen na kolegiju Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić te izrađen u Odjelu za međustaničnu komunikaciju Centra za translacijska i klinička ispitivanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom dr. sc. Hane Čipčić Paljetak.

# SADRŽAJ

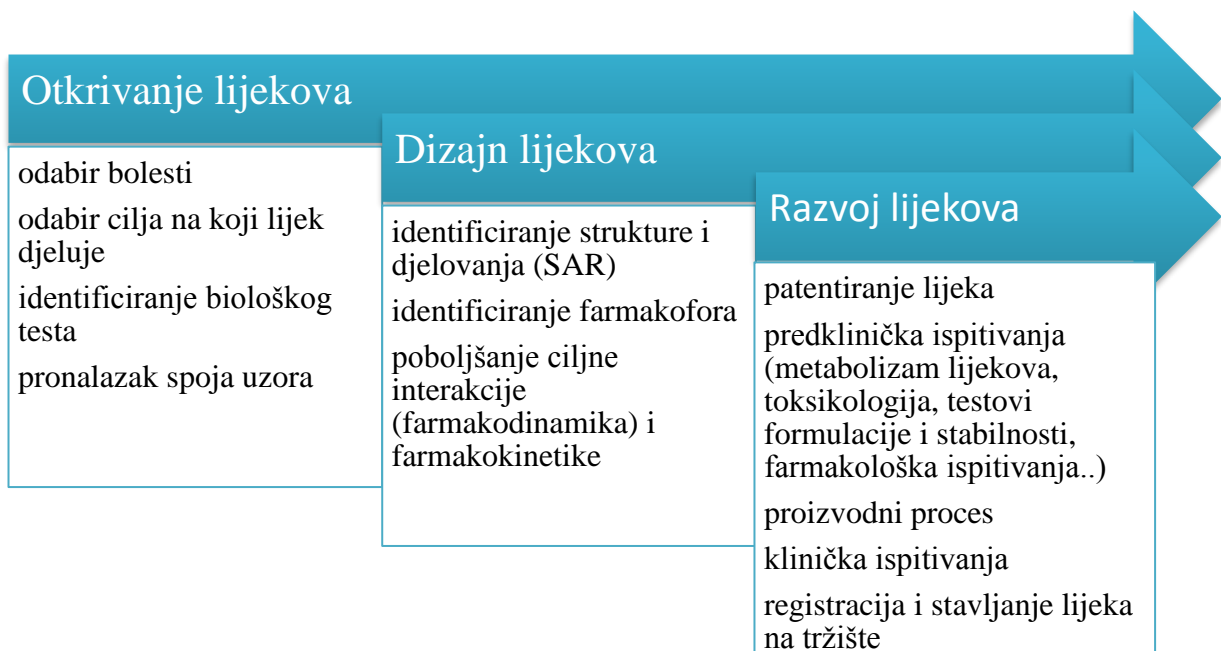
1	UVOD .....	1
1.1	Otkriće lijekova .....	3
1.1.1	Odabir bolesti .....	3
1.1.2	Odabir mete lijeka .....	3
1.1.3	Identifikacija biološkog testa.....	4
1.1.4	Traženje spoja uzora.....	8
1.2	Antibakterijska ispitivanja.....	11
1.2.1	Difuzijske metode.....	11
1.2.2	Dilucijske metode.....	14
1.2.3	ATP test bioluminescencije.....	16
1.2.4	Protočna citofluorometrija.....	17
1.3	Itakonska kiselina .....	18
2	OBRAZLOŽENJE TEME.....	19
3	MATERIJALI I METODE.....	21
3.1	Materijali .....	22
3.1.1	Testirani spojevi .....	22
3.1.2	Mikroorganizmi .....	24
3.1.3	Antibiotici i kemikalije.....	24
3.2	Metode.....	24
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	27
5	ZAKLJUČCI .....	32
6	LITERATURA.....	34
7	SAŽETAK/SUMMARY .....	39



# 1 UVOD

Prije 20. stoljeća većinu lijekova činile su različite biljne droge i napitci, a tek su sredinom 19. stoljeća izolirane i pročišćene aktivne tvari odgovorne za učinak, što je dovelo do razvoja farmaceutskih tvrtki koje postoje i danas. Kemičari su zatim ulagali velike napore kako bi poboljšali svojstva molekula koje je proizvela priroda. Iako su se shvatila neka od općih načela koja se i danas koriste pri dizajniranju lijekova, često se cijeli proces svodio na metodu pokušaja i pogreške.

Posljednjih su se godina događale revolucionarne promjene: razvoj prirodnih znanosti doveo je do puno boljeg razumijevanja bioloških procesa na staničnoj i molekularnoj razini. Zato danas većina istraživanja u farmaceutskoj industriji ili na sveučilištima započinje odabirom mete u organizmu, a zatim dizajniranjem lijeka koji će djelovati na nju. Općenito, u otkrivanju, dizajniranju i razvoju lijekova možemo prepoznati sljedeće faze:



## 1.1 Otkriće lijekova

### 1.1.1 Odabir bolesti

Prvi korak u razvoju lijekova je odabir bolesti za koju će taj lijek biti namijenjen. Iako bi prednost trebale imati one bolesti za koje još ne postoji odgovarajuća terapija, to često nije slučaj iz ekonomskih razloga. Razvoj novog lijeka zahtjeva ogromna ulaganja, pa farmaceutske kompanije žele biti što sigurnije da će ulaganje donijeti i odgovarajuću materijalnu korist. Zbog toga se istraživanja fokusiraju na bolesti koje su česte u razvijenom svijetu, jer će to tržište moći platiti nove, skuplje lijekove. Primjeri za takve bolesti su migrena, depresija, čir na želucu, pretilost, rak, kardiovaskularne bolesti. Sve manje istraživača bavi se razvojem novih lijekova za bolesti tropskih područja, koje se javljaju u nerazvijenim zemljama, ili zemljama u razvoju (Graham, 2013.).

### 1.1.2 Odabir mete lijeka

Idući je korak odabir prikladne mete lijeka u organizmu (receptor, enzim ili nukleinska kiselina). Kako bi to bilo moguće, potrebno je poznavati patofiziologiju bolesti na molekularnoj razini te na temelju toga odlučiti treba li dizajnirati lijek agonist ili antagonist nekoga receptora, ili lijek inhibitor pojedinog enzima (Graham, 2013.). Primjerice, agonisti serotoninskih receptora koriste se u liječenju migrene, dok se antagonisti dopaminskih receptora koriste kao antidepresivi (Katzung, 2018.). Jednom analizom temeljenom na lijekovima koji su stigli na tržište zaključilo se da postoji ukupno 417 meta lijekova, uključujući enzime, ionske kanale, receptore i dr. (Moos, 2007.). Ne zna se uvijek hoće li odabrana meta biti pogodna. Na primjer, znalo se da triciklički antidepresivi inhibiraju ponovni unos neurotransmitora noradrenalina iz živčane sinapse tako što inhibiraju transportni protein za noradrenalin. Međutim, ti lijekovi inhibiraju i ponovni unos serotonina, pa je postojala mogućnost da će i lijekovi koji inhibiraju samo ponovni unos serotonina ostvarivati učinak. Iako se nije znalo sa sigurnošću hoće li ti lijekovi biti učinkoviti, krenuli su se razvijati selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI), danas najprodavaniji antidepresivi (npr. fluoksetin) (Graham, 2018.).

U prošlosti je pronalazak mete lijeka slijedio nakon što se pronađe sam lijek. Poznavanjem djelovanja određenog lijeka otkrila bi se makromolekula na koju on djeluje (Graham, 2018.). Primjerice, opioidni analgetik morfin izoliran je iz opijuma, soka dobivenog cijedenjem nezrelih glavica vrtnog maka (lat. *Papaver somniferum*) ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).



Kasnije se otkrilo da se radi o agonistu mi opioidnih receptora (Katzung, 2018.). Otkriće mete lijeka baziralo se na principu pogodaka i pogrešaka. Kasnije su se otkrile brojne signalne molekule u organizmu pa tako i njihove mete. Primjerice, 1970-ih godina otkriveni su proteini i peptidi koji djeluju kao naši vlastiti analgetici (endorfini i enkefalini). I dalje je to bio samo mali broj otkrivenih signalnih molekula jer se one nisu mogle identificirati zbog kratkog poluvremena života, ili zbog vrlo niske koncentracije u kojoj su prisutni. S razvojem genomike i proteomike, kada se mapirala ljudska DNA, otkriveni su još brojni proteini koji mogu biti potencijalne mete lijekova u budućnosti. Za mnoge od njih još ne znamo signalne molekule, te ne postoje spojevi uzori koji bi djelovali na te mete koje nazivamo *orphan* receptorima (receptori siročad) (Graham, 2013.).

Poželjno je selektivno djelovanje prema meti jer će na taj način biti manje nuspojava. Tako je za antimikrobne lijekove poželjno da djeluju samo na mete mikroorganizama. Primjerice, penicilin inhibira enzim uključen u sintezu stanične stijenke bakterija, dok ljudske stanice nemaju staničnu stijenku i taj enzim. Ako je meta lijeka prisutna u mikroorganizmu i kod čovjeka, dizajnirani lijek mora pokazivati selektivnost prema mikrobnjoj meti. To je često moguće jer je tijekom evolucije došlo do značajnih strukturnih razlika između enzima koji kataliziraju istu reakciju u eukariotskoj i bakterijskoj stanici. Na primjer, antimikotik flukonazol inhibira enzim demetilazu koji je uključen u biosintezu steroida. Iako je taj enzim prisutan i kod čovjeka, zbog značajnih strukturnih razlika lijek je visoko selektivan prema enzimu gljivica. (Graham, 2013.)

Inhibitori enzima trebali bi biti specifični prema točno određenom izoenzimu, a agonisti i antagonisti receptora prema podtipu određenog receptora. Primjerice, tradicionalni su antipsihotici antagonisti dopaminskih D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> receptora, no djelovanje na D<sub>2</sub> receptore povezano je s neželjenim učincima, pa se traže selektivni D<sub>3</sub> antagonisti. (Graham, 2013.)

### **1.1.3 Identifikacija biološkog testa**

Odabir ispravnog biološkog testa ključan je za uspjeh istraživanja lijekova. Test treba biti jednostavan, brz i relevantan jer je potrebno analizirati mnogo spojeva. Ispitivanje na ljudima nije moguće u ranoj fazi, pa se koriste *in vitro* (na izoliranim stanicama, tkivima, enzimima, ili receptorima) ili *in vivo* (na životinjama) testovi. Općenito, *in vitro* testovi preferiraju se nad *in vivo* testovima jer su jeftiniji, lakši za izvođenje, manje kontroverzni i mogu se automatizirati. Međutim, *in vivo* testovi često su potrebni kako bi provjerili imaju li lijekovi željene farmakološke aktivnosti, te za praćenje njihovih farmakokinetičkih svojstava.

Danas se ispitivanja obično provode *in vitro* i *in vivo* da se utvrdi ne samo djeluju li lijekovi na željeni cilj, nego djeluju li i na ostale neželjene ciljeve. Nakon određenog broja testova donosi se odluka hoće li lijek ići u daljnja istraživanja. Potrebna je visoka razina aktivnosti na izabranoj meti i minimalna aktivnost na ostalim metama zbog što manjih nuspojava. Na ovaj se način uvelike smanjuje vjerojatnost da će se ogromni financijski resursi izgubiti za razvoj lijeka koji ili neće uspjeti u kliničkim ispitivanjima ili će biti povučen s tržišta (Graham, 2013.).

### ***In vitro* ispitivanja**

Do 1970-ih godina prošlog stoljeća glavnu ulogu u *in vitro* ispitivanjima imali su podjednako i biokemijski i stanični modeli, no broj testova koji se mogao izvoditi bio je ograničen zbog konvencionalnih metoda izolacije proteina – meta, kao i zbog ograničenog broja stanica koje eksprimiraju metu od interesa. 1970-ih godina su ti problemi riješeni pojavom rekombinantne DNA, lančane reakcije polimeraze (PCR) i sličnih tehnika koje su omogućile stvaranje staničnih linija koje u velikoj količini izražavaju proteine od interesa (Blass, 2015.). Gen koji kodira sintezu željenog receptora identificira se, klonira i izražava u bakterijama, gljivicama ili tumorskim stanicama. Npr. stanice jajnika kineskog hrčka (CHO stanice – Chinese hamster ovarian cells) često se koriste jer na površini izražavaju veliki broj receptora.

Nadalje, razvoj robota i minijaturizacija *in vitro* testova na genetski modificiranim stanicama doveli su do pretraživanja visokog kapaciteta (engl. high throughput screening, HTS). Radi se o automatskom testiranju djelovanja velikog broja spojeva na veliki broj meta. Odjednom se može ispitati nekoliko tisuća spojeva u 30 – 50 bioloških testova. Ranije su se spojevi automatski testirali na pločici s 96 jažica, od kojih svaka ima kapacitet 0,1 mL, a danas se u ispitivanjima koriste pločice jednake veličine, ali s 1536 jažica volumena 1-10  $\mu$ L (Graham, 2013.).

Tipični primjeri biokemijskih testovova jesu testovi inhibicije enzima, testovi za praćenje protein – protein interakcije, kao i vezanja na receptore. Ono što je važno naglasiti, oni se ne odvijaju u kontekstu stanice i zato imaju određena ograničenja. Primjerice, ne mogu dati informaciju o tome kakve će posljedice inhibicija pojedinog enzima imati na stanicu. Isto tako, ne zna se posljedica vezanja spoja na receptor pa na temelju biokemijskih ispitivanja ne možemo znati radi li se o agonistu ili antagonistu. Odgovore na ta pitanja mogu dati testovi na stanicama. Također, ponekad se neka meta ne može izolirati iz stanice pa su testovi na stanicama jedina opcija. Nedostatak tih testova mogući su lažno pozitivni i lažno negativni rezultati zbog interakcije s drugim metama u stanici osim ciljne mete (Blass, 2015.).

Inhibitori enzima ispituju se na čistim enzimima u otopini radi određivanja tipa inhibicije (kompetitivna, nekompetitivna) i jačine inhibicije (određivanje  $IC_{50}$  vrijednosti) (Graham, 2013.). Vrijednost  $IC_{50}$  predstavlja onu koncentraciju spoja pri kojoj je ostvareno 50% maksimalnog učinka (Blass, 2015.), u ovom slučaju inhibicije.

Agonisti i antagonisti receptora mogu se testirati na izoliranim tkivima ili stanicama koje ekspimiraju željene receptore na površini. Ponekad se tkiva mogu koristiti za ispitivanje fizioloških učinaka lijeka. Npr. aktivnost bronhodilatatora može se testirati promatranjem inhibicije kontrakcije izoliranog trahealnog glatkog mišića.

Afinitet lijeka prema receptoru može se mjeriti i radio – ligandnim studijama. Određeni ligand za željeni receptor obilježi se radioizotopom i dodaje stanicama koje ekspimiraju taj receptor. Nakon uspostave ravnoteže, nevezani ligand uklanja se pranjem, filtracijom ili centrifugiranjem. Količina vezanog liganda može se mjeriti detekcijom prisutne radioaktivnosti u stanicama, odnosno detekcijom radioaktivnosti koja je uklonjena (Graham, 2013.).

*In vitro* studije na stanicama korisne su u početku istraživanja lijeka, jer nema komplikacija povezanih s *in vivo* uvjetima, kao što su prelaženje lijeka preko barijera ili preživljavanje lijeka u doticaju s metaboličkim enzimima. Također, korištenje staničnih kultura nije moralno upitno i zadovoljava društvenu težnju za smanjenjem korištenja životinja u eksperimentalne svrhe (Dayeh i sur., 2013). Razlikujemo primarne i transformirane stanične kulture. Primarne kulture nisu modificirane i njih proizvode embrionska tkiva, dok transformirane stanične kulture nastaju od tumorskog tkiva (Graham, 2013.). Inicijalno uspostavljene stanične kulture nazivaju se primarnim staničnim kulturama i one obično rastu dok ne prekriju površinu dna posudice u kojoj se nalaze. Stanice se nakon toga mogu nasaditi u nove posudice što predstavlja sekundarnu kulturu. Taj se proces presađivanja može ponoviti mnogo puta, no većina stanica u kulturi ipak ne može beskonačno rasti. Nasuprot tomu, tumorske stanice imaju sposobnost neograničene proliferacije pa formiraju besmrtnne stanične linije koje su iznimno korisne u istraživanjima jer predstavljaju kontinuiran i relativno uniforman izvor stanica (Cooper i Hausman, 2004). *In vitro* testovi mogu se koristiti i za primarno ispitivanje farmakokinetike. Model apsorpcije na Caco-2 monosloju stanica koristi se za procjenu vjerojatnosti apsorpcije lijekova iz gastrointestinalnoga trakta (GIT). Caco-2 stanice su stanice humanog kolorektalnog karcinoma, koje se pod određenim uvjetima diferenciraju i polariziraju pa oponašaju enterocite tankog crijeva. Mikrosomi i hepatociti ekstrahirani iz jetrenih stanica sadrže enzime citokrom-P450 i mogu se koristiti za predviđanje

metaboličkih interakcija kojima će podlijevati spojevi kandidati, kao i za uočavanje potencijalnih lijek - lijek interakcija.

Antibakterijski lijekovi testiraju se mjerenjem njihove učinkovitosti inhibicije rasta ili ubijanja mikroorganizama (MIK = minimalna inhibitorna koncentracija, MMK = minimalna mikrobiocidna koncentracija) (Graham, 2013.).

### ***In vivo* ispitivanja**

*In vivo* testovi na životinjama neophodni su za utvrđivanje učinka lijeka na organske sustave i modele bolesti. Najčešće se prvo provode ispitivanja kardiovaskularne i renalne funkcije na zdravim životinjama. Zatim se induciraju simptomi bolesti kod životinja pa prate promjene tih simptoma s primjenom potencijalnog lijeka (Katzung, 2018.). Primjerice, nesteroidni protuupalni lijekovi testiraju se na životinjama kojima je inducirano upalno stanje (Graham, 2013.). Potom se prikupe podaci o trajanju djelovanja i djelotvornosti nakon oralne i parenteralne primjene. Ako je spoj pokazao korisnu aktivnost, ispitat će se i mogući štetni učinci na druge organe, uključujući respiratorni i gastrointestinalni trakt, bubrege, endokrini sustav i središnji živčani sustav.

Ove studije mogu sugerirati potrebu za modifikacijom strukture spoja kako bi se postigla poželjnija farmakokinetička ili farmakodinamička svojstva. Na primjer, studije oralne primjene lijeka mogle bi pokazati da se lijek loše apsorbira iz GIT-a ili brzo metabolizira u jetri; izmjena može dovesti do poboljšane bioraspodivost (Katzung, 2018.).

Najčešće se u ispitivanjima koriste transgenični miševi kojima je promijenjen genetski kod. Primjerice, neki mišji gen zamijenjen je humanim genom, pa miš proizvodi humani enzim ili receptor, što omogućava *in vivo* testiranje djelovanja spoja na tu metu. Također, neki mišji geni mogu biti promijenjeni, pa miš predstavlja životinjski model određene bolesti. Nakon toga testiraju se potencijalni lijekovi za tu bolest.

Problemi vezani uz *in vivo* ispitivanja: testiranje je sporo i uzrokuje patnju životinja, javljaju se mnogi farmakokinetički problemi, dobiveni rezultati mogu zavarati i teško ih je protumačiti ako se ne izvode uz *in vitro* testove, određeni *in vivo* testovi mogu se pokazati pogrešnima (moguće da neki spojevi koji djeluju na životinje na ljude uopće ne djeluju), s različitim životinjama mogu se dobiti različiti rezultati (prolijekovi penicilina se hidroliziraju u aktivne peniciline u miševima i štakorima, ali ne i u zečevima) (Graham, 2013.).

#### 1.1.4 Traženje spoja uzora

Kad je nađena meta i odabrana metoda testiranja, slijedi identifikacija novih, neotkrivenih, biološki aktivnih spojeva, koji se nazivaju spojevi uzori. Oni ne moraju imati jako djelovanje, te mogu imati niz nuspojava, ali to su spojevi od kojih kreće dizajniranje i razvoj lijekova (Graham, 2013.).

Idealni spoj uzor morao bi imati sljedeća svojstva: da se lako se sintetizira, serija spojeva srodna spoju uzoru može se lako patentirati, prihvatljive je topljivosti, permeabilnosti i vezanja na proteine, nije inhibitor ili aduktor citokroma-P450, nije inhibitor HERG-a (gen koji kodira protein kalijevih ionskih kanala, a čija inhibicija može izazvati srčani arrest), prihvatljive je apsorpcije-distribucije-metabolizma-eliminacije (ADME), potvrđena je interakcija s biološkom metom, definiran je odnos strukture i djelovanja (SAR), potvrđena je biološka aktivnost *in vivo* (Rajić, Odabrana poglavlja iz farmaceutske kemije).

##### 1.1.4.1 Pretraživanje prirodnih produkata

Sve do kraja 19. stoljeća otkrivanje novih kemijskih entiteta za ljekovite svrhe uglavnom se temeljilo na prirodnim produktima iz biljnih izvora. Kako su europske kolonijalne sile otkrile nove zemlje na zapadnoj hemisferi i kolonizirane Aziju, Europljani su od starosjedilačkih naroda preuzeli lijekove za mnoge tegobe dobivene iz ljekovitog bilja. Salicilna kiselina izolirana je iz kore vrbe nakon što se vidjelo da Indijanci uzgajaju koru vrbe za liječenje različitih upalnih tegoba. Optimizacijom spoja uzora (salicilna kiselina), njemačka korporacija Bayer proizvela je acetilsalicilnu kiselinu, prvi nesteroidni protuupalni lijek (Lemke i Williams, 2007.). Revolucionarno otkriće u liječenju malarije uzrokovane nametnikom *Plasmodium falciparum* bilo je otkriće kinina, alkaloida iz kore *Cinchone*. Agostino Salombrino, isusovac koji je živio u Peruu, primjetio je da tamošnji domorodci žvaču koru *Cinchone* kako bi ublažili groznicu. Pomislio je kako bi *Cinchona* imala pozitivan učinak i na groznicu kao jedan od simptoma malarije, pa je uzorak biljke poslao u Rim, ni ne sluteći da će spoj iz te biljke biti prva linija u liječenju malarije sve do 2006. (Blass, 2015.). Sljedeći tragove iz narodne medicine, kemičari s kraja 19. i početka 20. stoljeća počeli su tražiti nove spojeve iz biljnih izvora i ispitivali njihova farmakološka djelovanja. Takav je pristup danas gotovo u potpunosti zamijenjen racionalnim dizajniranjem novih lijekova jer su spojevi iz biljnih izvora najčešće vrlo kompleksne strukture i teško ih je sintetizirati pa se moraju neprestano izolirati iz biljnog materijala, što je sporo, skupo i neefikasno (Lemke i Williams, 2007.).

Osim u biljkama, aktivne se molekule mogu naći i u sljedećim izvorima:

- Mikroorganizmi

Oni proizvode spojeve koji im omogućavaju preživljavanje, odnosno ubijanje protivnika (gljivica i drugih bakterija). Nakon što je otkriven penicilin, ispitivanja na mikroorganizmima su se intenzivirala, a to je dovelo do razvoja novih skupina antibiotika: cefalosporina, tetraciklina, aminoglikozida, rifampicina, kloramfenikola i vankomicina. Iako se većina spojeva iz mikroorganizama koriste kao lijekovi, neki su poslužili i kao spojevi uzori (Graham, 2013.)

- Morski organizmi

Koralji, spužve, ribe, a morski mikroorganizmi sadrže bogatstvo spojeva sa zanimljivim protuupalnim, antivirusnim i antikancerogenim djelovanjem. Cijanobakterije sadrže mnoge spojeve s antitumorskim djelovanjem: kuracin A (inhibitor povezivanja mikrotubula), bisebromoamid, hoiamid A i D, izomalingamid (Babić, 2018.). Ostala antitumorska sredstva koja potječu iz morskih izvora uključuju eleuterobin, briostatin, dolastatin, cefalostatin i halihondrin B. 2010. godine odobren je pojednostavljeni analog halihondrina B za liječenje raka dojke (Graham, 2013.).

- Životinje

Serijski antibiotički polipeptidi margainina izolirana je iz kože afričke žabe *Xenopus laevis* (Graham, 2013.). Drugi primjer je snažni analgetski spoj nazvan epibatidin, dobiven iz ekstrakta kože ekvadorske otrovne žabe. Alkaloidni epibatidin, snažan analgetski spoj, do sada je otkriven u prirodi samo od nekoliko populacija ekvadorskih žaba iz roda *Epipedobates* (Daly i sur., 1999.).

- Otrovi i toksini

Otrovi i toksini iz životinja, biljaka, zmija, pauka, škorpiona, insekata i mikroorganizama često ulaze u vrlo precizne interakcije s makromolekularnim metama u tijelu. Zato su se pokazali važnim alatima u proučavanju receptora, ionskih kanala i enzima. Mnogi od tih toksina su polipeptidi. Otrovi i toksini korišteni su i kao spojevi uzori u razvoju novih lijekova. Na primjer, teprotid, peptid izoliran iz venoma brazilske zmije, bio je spoj uzor za razvoj antihipertenzivnih lijekova cilazaprila i kaptoprila. Neurotoksini iz *Clostridium botulinum* odgovorni su za ozbiljno trovanje hranom (botulizam), ali imaju i kliničku upotrebu (Graham,

2013.). Koristi se u liječenju neuroloških poremećaja (fokalnog spasciteta, blefarospazma, hemifacijalnog spazma, cervikalne distonije), poremećaja mokraćnog mjehura (idiopatske prekomjerne aktivnosti mokraćnog mjehura, prekomjernom neurogenom aktivnošću detruzora), poremećaja kože i kožnih privjesaka ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr))

#### ***1.1.4.2 Pretraživanje ranije sintetiziranih spojeva***

Farmaceutske kompanije posjeduju tisuće spojeva koje nikada nisu došle na tržište. Kada se ispituje nova meta lijekova, testiraju se i ti spojevi radi pronalaženja spoja uzora. Nekada se kupuju novi spojevi koje su sintetizirale istraživačke skupine na fakultetima. Također, korisno može biti testirati i intermedijare koji nastaju pri nekoj sintezi. Primjerice, 1950-ih godina sintetiziran je i testiran niz tiosemikarbazona, uključujući i izonikotinaldehid tiosemikarbazon, čija je sinteza uključivala hidrazid izoniazid. Utvrđeno je da izoniazid ima veću aktivnost nego ciljna struktura.

Mnoge tvrtke koriste već postojeće lijekove svojih konkurenata kao spojeve uzore novog lijeka. Primjerice, kaptopril je korišten kao spoj uzor u proizvodnji idućih generacija antihipertenzivnih lijekova ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). Iako su se često pogrdno nazivali „me too“ lijekovi, činjenica je da najčešće imaju poboljšana svojstva u odnosu na izvorne. Tako su novi penicilini selektivniji, učinkovitiji i stabilniji nego originalni.

Moguće je i da nuspojave nekog lijeka budu korisne u liječenju druge bolesti. Na primjer, sulfonamidi su primarno razvijeni kao antibiotici, no neki od njih se nisu mogli koristiti u praksi zbog jake hipoglikemije koju su izazivali. Ta činjenica se iskoristila u razvoju sulfonilurea kao antidijabetika. Sulfonamid je korišten i u razvoju sulfonamidskih diuretika (klorotiazida) jer u velikim dozama djeluje kao diuretik zbog inhibicije karboanhidraze (Graham, 2013.).

#### ***1.1.4.3 Prirodni ligandi ili modulatori***

Prirodni ligand ciljnog receptora može se koristiti kao spoj uzor. Na primjer, adrenalin i noradrenalin bili su spojevi uzori za agoniste  $\beta$ -adrenergičkih receptora (salbutamol, dobutamin), 5-hidroksitriptamin je bio spoj uzor za razvoj 5-HT<sub>1</sub> agonista (sumatriptan), histamin za razvoj antagonista H<sub>2</sub>-receptora (cimetidin) (Graham, 2013.). Agonist je spoj koji ima afinitet za receptor i sposoban je proizvesti pozitivni biološki odgovor kao rezultat njegove

interakcije s receptorom. Sposobnost stvaranja odgovora naziva se "djelotvornost" ili "intrinzična aktivnost". S druge strane, antagonisti su spojevi koji imaju afinitet za receptor, ali ne aktiviraju receptor, tj. izostaje intrinzična aktivnost. Afinitet spoja prema receptoru ovisi o njegovim trodimenzionalnim karakteristikama, poput veličine, stereokemijske orijentacije, funkcionalnih skupina, i njegovim fizičkim i elektrokemijskim svojstvima (Lemke i Williams, 2007.).

Prirodni supstrat enzima, kao i njegov produkt, također mogu biti spojevi uzori. Na primjer, prirodni supstrat za HIV-proteazu iskorišten je kao spoj uzor za razvoj inhibitora HIV-proteaze (Chu i sur, 2015.). Inhibitori karboksipeptidaze L-benzilsukcinatne kiseline nastali su na temelju produkata karboksipeptidazom katalizirane hidrolize peptida (Ariëns, 1975.).

Modulatori receptora ili enzima, tj. spojevi koji utječu na alosteričke modifikacije receptora i enzima, također mogu poslužiti kao spojevi uzori. Primjerice, endogeni peptidi endopini se vežu na alosteričko mjesto GABA receptora i mogu poslužiti kao spojevi uzori za lijekove istog djelovanja kao i benzodiazepini (Cooper, 1983.).

Postoji i čitav niz primjera slučajnog pronalaska spoja uzora. Tako je ciklosporin A izoliran iz tla tijekom potrage za antibioticima. Srećom, pretraživanje spojeva bilo je općenito pa je utvrđeno da je ciklosporin imunosupresiv. Danas se koristi za sprječavanje odbacivanja organa i koštane srži nakon transplatacije (Graham, 2013.).

## **1.2 Antibakterijska ispitivanja**

U kontekstu otkrića lijeka, jedno od *in vitro* ispitivanja je i ispitivanje antibakterijskog djelovanja.

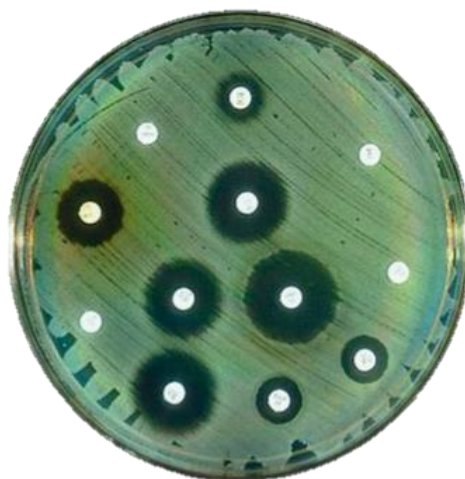
### **1.2.1 Difuzijske metode**

#### **1.2.1.1 Metoda disk difuzije**

Disk-difuzijsko ispitivanje na agaru razvijeno je 1940. godine (Heatley, 1944.), a danas je službena metoda koja se koristi u mnogim kliničkim mikrobiološkim laboratorijima za rutinsko ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove. Ploče s agarima inokuliraju se sa standardiziranim inokulom testnog mikroorganizma. Zatim se filter papir u obliku diska (promjera oko 6 mm) koji sadrže ispitivani spoj u željenoj koncentraciji postavljaju na površinu agara. Petrijeve se zdjelice inkubiraju u prikladnim uvjetima. Antimikrobno sredstvo difundira u agar i inhibira rast testnog mikroorganizma. Mjere se promjeri zona inhibicije rasta (Balouiri



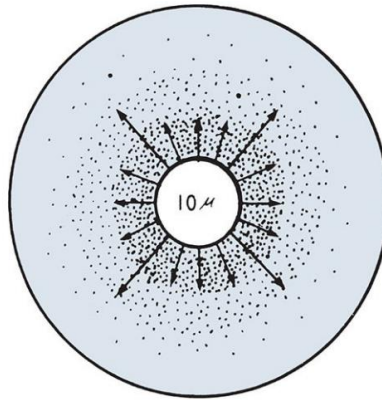
2016.). Međutim, inhibicija rasta bakterija ne znači i njihovu smrt pa ova metoda ne može razlikovati baktericidne i bakteriostatske učinke. Također, metoda nije prikladna za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) zbog čega nema primjenu u otkriću lijekova. Približan MIK može se izračunati za neke mikroorganizme i antibiotike uspoređujući zone inhibicije s postojećim algoritamima (Nijs i sur., 2003.). Brojne prednosti ove metode jesu: jednostavnost, niski troškovi, sposobnost testiranja velikog broja mikroorganizama i antimikrobnih sredstava te lakoća tumačenja dobivenih rezultata (Kreger i sur., 1980.)



**Slika 1** Primjer testa disk – difuzije ( Sandle, 2016. )

Preporuka CLSI-a (engl. Clinical Laboratory Standards Institute) je da udaljenost među diskovima na ploči s agarom bude 24 mm (mjereći od sredine diska) kako ne bi došlo do preklapanja u inhibicijskim zonama. Između inokulacije agara bakterijama i primjene diska trebalo bi proći najviše 15 minuta (Hudzicki, 2009.).

Čim disk s antimikrobnim agensom dođe u dodir s vlažnom površinom agara, voda se apsorbira u filter papir i antimikrobno sredstvo difundira u okolni medij. Brzina ekstrakcije antimikrobnog sredstva iz diska je veća od brzine difuzije kroz medij, pa se koncentracija antimikrobnog sredstva smanjuje s udaljavanjem od diska. Kako je medij prethodno inokuliran bakterijskom suspenzijom, dolazi do rasta bakterija na površini agara. Kad je postignuta kritična stanična masa bakterija, inhibirajući učinak antimikrobnog sredstva je premašen i javlja se bakterijski rast (W. Procop i sur., 2017.).



Slika 2 Načelo difuzije antibiotika u agaru. Koncentracija antibiotika se smanjuje s porastom udaljenosti od diska

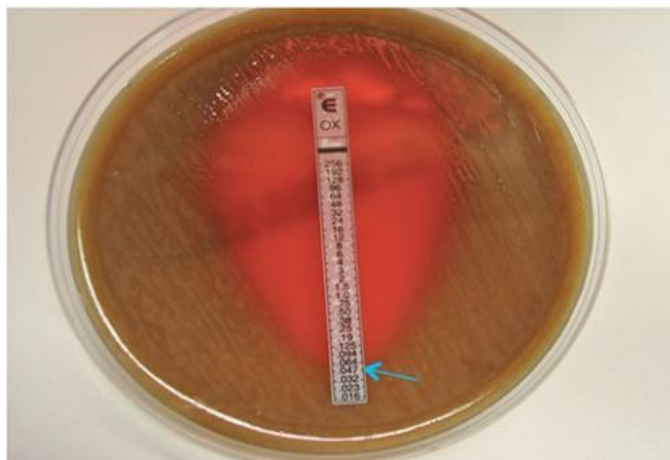
(W. Procop i sur., 2017.)

### ***1.2.1.2 Antimikrobna gradijentna metoda***

Antimikrobna gradijentna metoda kombinira princip metode dilucije s metodama difuzije kako bi se odredila vrijednost MIK-a. Temelji se na stvaranju koncentracijskog gradijenta antimikrobnog sredstva u agar mediju. Etest (BioMérieux) je komercijalna inačica ove tehnike. Traka impregnirana s rastućim gradijentom koncentracije antimikrobnog sredstva se nanosi na površinu agara prethodno inokuliranog ispitivanim mikroorganizmom. Ova metoda se koristi za određivanje MIK-a antibiotika, antifungicida i antimikotika (Hausdorfer i sur., 1998.). Vrijednost MIK-a se određuje na sjecištu trake i elipse koja predstavlja inhibiciju rasta. Prednost metode je njena jednostavnost i mogućnost određivanja MIK-a, a nedostatak visoka cijena ako je potrebno puno testiranja (Balouiri, 2016.).

Ova se tehnika također može koristiti za ispitivanje interakcije između dvaju antimikrobnih lijekova (White i sur., 1996.). Etest traka, impregnirana prvim antibiotikom, stavlja se na površinu inokuliranog agara. Nakon jednog sata traka se ukloni i zamijeni onom impregniranom drugim antibiotikom. Sinergija se otkriva smanjenjem MIK-a za najmanje dva

razrjeđenja u usporedbi s onim najaktivnijeg antibiotika kad se testira sam (Denes i Hidri, 2009.).



Slika 3 Oxacillin Etest—*S. pneumoniae*. MIK = 0.47 µg/mL (W. Procop i sur., 2017.).

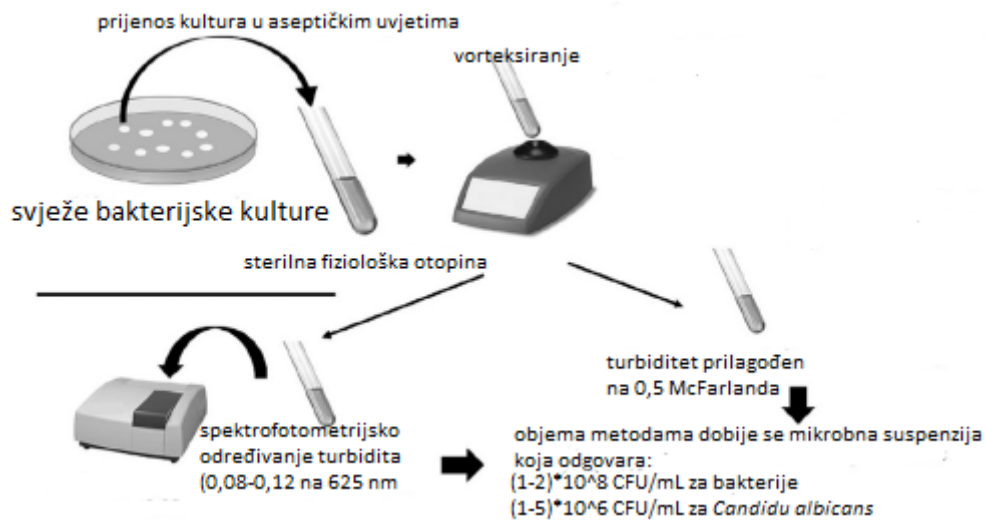
## 1.2.2 Dilucijske metode

Dilucijske su metode najpogodnije za određivanje MIK-a. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je vrijednost definirana kao najniža koncentracija ispitivanog antimikrobnog sredstva koja inhibira vidljivi rast ispitivanog mikroorganizma, a obično se izražava u mg/mL ili mg/L (Balouiri, 2016.).

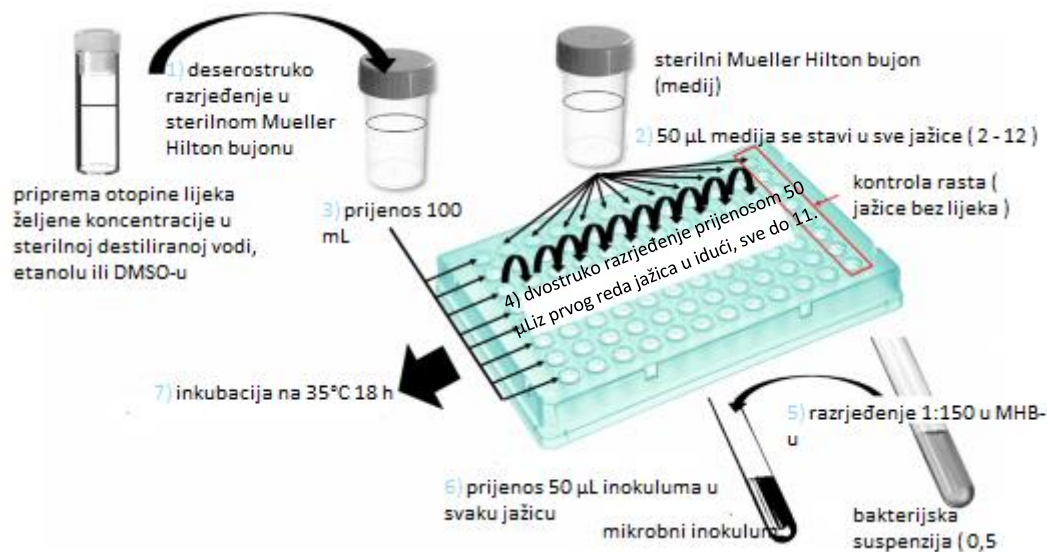
### 1.2.2.1 Metoda bujon-dilucije

Metoda bujon-dilucije jedna je od najosnovnijih metoda za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne pripravke. Postupak uključuje pripremu dvostrukog razrjeđenja antimikrobnog sredstva u tekućem mediju, ili u epruvetama (makrodilucija) ili mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (mikrodilucija). Medij koji sadrži antimikrobno sredstvo inokulira se bakterijskim inokulom, a on se priprema tako da se svježe bakterijske kulture otope u fiziološkoj otopini do gustoće od 0,5 McFarlanda i onda razrijede u hranjivom mediju. MIK je najmanja koncentracija antimikrobnog sredstva koja potpuno inhibira rast organizama u epruvetama ili jažicama, što je vidljivo golim okom. Različiti uređaji mogu olakšati očitavanje rezultata kod mikrodilucijske metode, a razvijene su i kolorimetrijske metode. Često se koriste tetrazolijeve soli i alamar plava boja. Količina inokula, vrsta hranjivog medija, vrijeme inkubacije i priprema inokula

moгу utjecati na vrijednosti MIK-a. Zato je CLSI standardizirao metodu za ispitivanje aerobnih bakterija, kvasaca i gljivica (Balouiri, 2016.).



Slika 4 Priprema mikrobnog inokuluma prema CLSI smjernicama (prilagođeno iz Balouiri, 2016.)



Slika 5 Postupak bujon - mikrodilucije prema CLSI smjernicama (prilagođeno iz Balouiri, 2016.)

### 1.2.2.2 Metoda agar – dilucije

Agar dilucija jest referentna metoda za ispitivanje antibakterijskoga djelovanja pomoću krutog medija. Standardizirana se bakterijska suspenzija inokulira na niz ploča sa agarima, od kojih svaka sadrži različitu koncentraciju antimikrobnog sredstva, obuhvaćajući terapijski raspon lijeka. Na primjer, ako je terapijski raspon za određeno antimikrobno sredstvo 2 do 12

$\mu\text{g/mL}$ , za utvrđivanje osjetljivosti mikroorganizma koji se testira može se upotrijebiti serija ploča s agarima koja sadrže 1, 4, 8, 16 i 32  $\mu\text{g/ml}$  antimikrobnog sredstva. Ako mikroorganizam raste na prve tri ploče, ali ne u ploči koja sadrži 16  $\mu\text{g/mL}$  antimikrobnog sredstva, tada je utvrđena MIK od 16  $\mu\text{g/mL}$  (W. Procop i sur., 2017.).

Ako se ispituje više izolata na pojedinačni spoj ili ako testirani spoj (ili ekstrakt) svojom bojom maskira rast mikroba u tekućem mediju, agar metoda dilucije preferira se nad bujon–dilucijom za određivanje MIK-a. Danas su komercijalno dostupni replikatorni inokuliranja kojim se može prenijeti između 32 i 60 različitih bakterijskih inokuluma na svaku ploču s agarom. Agar dilucija često se preporučuje kao standardizirana metoda za anaerobne bakterije i vrste *Helicobacter*. Također se koristi za ispitivanje antifungalnih sredstava i lijekova protiv vrsta *Candida sp.*, *Aspergillus*, *Fusarium* i dermatofita (Balouiri, 2016.).

### **1.2.2.3 Time – kill test**

To je najprikladnija metoda za određivanje baktericidnog ili fungicidnog učinka, ali i snažan alat za dobivanje informacija o dinamičkoj interakciji između antimikrobnog agensa i mikroba. Rezultati testa su prikazani kao o vremenu ovisan ili o koncentraciji ovisan antimikrobni učinak (Pfaller i sur., 2004.)

CLSI je standardizirao i opisao ovaj test za bakterije. Izvodi se u bujonu, koristeći 3 epruvete koje sadrže bakterijsku suspenziju koncentracije  $5 \cdot 10^5$  CFU/mL. Prva i druga epruveta sadrže testirani spoj, dok treća služi kao kontrola rasta. Inkubacija se izvodi pri propisanim uvjetima u određenim vremenskim intervalima (0, 4, 6, 8, 10, 12 i 24 h). Zatim se računa relativni postotak mrtvih stanica u odnosu na kontrolu, tako što se odredi broj živih mikroba (CFU/ mL) u svakoj epruveti. Baktericidni učinak odgovara smrtnosti od 90 % mikroba u 6 h, odnosno 99,9 % u 24 h ( Balouiri, 2016.).

### **1.2.3 ATP test bioluminescencije**

Test se temelji na mjerenju koncentracije adenozin-trifosfata (ATP-a) kojeg proizvode bakterije ili gljivice. Budući da je to kemijski oblik energije u stanicama, ATP je prisutan u otprilike konstantnim količinama. Zbog toga se njegova kvantifikacija može koristiti za procjenu količine mikroba u uzorku. Diluciferin se u prisutnosti ATP-a konvertira pomoću enzima luciferaze u oksiluciferin koji emitira svjetlost. Količina emitirane svjetlosti mjeri se

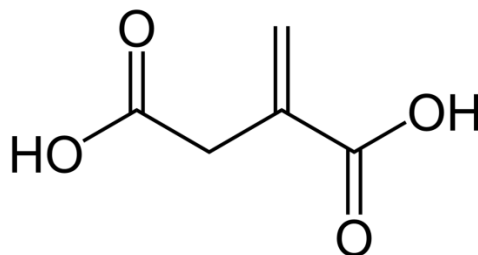
luminometrom i izražava kao relativna svjetlosna jedinica (engl. RLU, relative light unit), koja se može pretvoriti u RLU/mol ATP-a. Prednost ove metode je njezina brzina: za 3-5 dana mogu se dobiti rezultati, dok konvencionalne metode obično traju 3- 4 tjedna (Finger i sur., 2013.).

#### **1.2.4 Protočna citofluorometrija**

Korištenje protočne citometrije za ispitivanje osjetljivosti mikroorganizama predloženo je prije nekoliko godina. Brzo otkrivanje oštećenih stanica ovom metodom moguće je korištenjem odgovarajućih boja (Balouiri, 2016.). Nekoliko studija pokazalo je učinkovitost protočne citometrije kao alata za antibakterijsko ispitivanje protiv *Listeriae monocytogenes*, koristeći kombinirano bojenje PI-om (propidijev jodid) za procjenu oštećenja membrane, te karboksifluoresceinskim diacetatom (cFDA) za otkrivanje aktivnosti esteraze (Paparella i sur., 2008.). Prema tome, pored liziranih stanica, ovom se metodom mogu jasno razlikovati 3 subpopulacije (mrtve, vitalne i ozlijeđene stanice). Kvantifikacija ozlijeđenih stanica ima važnu ulogu u mikrobiologiji hrane jer bi pod određenim uvjetima (npr. temperatura skladištenja) opravak takvih stanica mogao postat mogućim (Yousef i Courtney, 2003.). Protočna citofluorometrijska metoda omogućuje otkrivanje antimikrobne rezistencije i procjenjuje utjecaj ispitivane molekule na održivost i oštećenje stanica ispitivanog mikroorganizma. Raširena uporaba ove metodologije za osjetljivost na antimikrobne lijekove trenutno nije moguća zbog nedostatka potrebne opreme u laboratorijima (Balouiri, 2016.).

### 1.3 Itakonska kiselina

Itakonska kiselina jest dikarboksilna kiselina koja sadrži egzometilenski dio konjugiran s karbonilnom skupinom. Spojevi s itakonatnom jezgrom prirodne su tvari izolirane iz različitih vrsta lišajeva i gljivica. Na primjer, cheatomelne kiseline, metabolički produkti lišaja *Chaetomella*, poznati su kao snažni inhibitori farnezil-transferaze i korisni su za razvoj lijekova protiv raka (Gibbs i sur., 1993.). Itakonat je također metabolit specifičan za makrofage - posreduje antimikrobne funkcije u makrofagu inhibirajući izocitratnu liazu, jednog od enzima bakterijskog mehanizma preživljavanja (Cordes i sur., 2015.).



Slika 6 Kemijska struktura itakonske kiseline (preuzeto s : [https://sh.wikipedia.org/wiki/Itakonska\\_kiselina](https://sh.wikipedia.org/wiki/Itakonska_kiselina), 7.4.2020.)

Reaktivna alfa-metilenska jedinica u itakonskoj kiselini omogućuje umrežavanje ili polimerizaciju, pa je moguće napraviti njezine polimere i kopolimere (Zerkowski i Solaiman, 2014). Spojevi s izloženim nezasićenim  $\beta$ -ugljicima smatraju se najboljim supstratima za Michaelovu adiciju. Michaelovi akceptori prisutni su u velikom broju lijekova protiv raka, kao i u mnogim prirodnim proizvodima. Entakapon, dimetil fumarat, rupintrivir, zanamivir i bulakvin lijekovi su koji se koriste u terapiji Parkinsonove bolesti, psorijaze, multiple skleroze, virusnih infekcija ili malarije, dok leptomicin ima antikancerogeno, antifungalno i antibakterijsko djelovanje (Hamamoto i sur., 1983). Lijekovi Michaelovi akceptori nepovratno se vežu na cisteinski ostatak specifičnog proteina (Kudo i sur., 1999.) Na primjer, inhibitori receptora epidermalnog faktora rasta - tirozin-kinaza (EGFR-TKI), poput afatiniba, neratiniba,

osimertiniba, ibrutiniba, kovalentno se vežu na ostatak cisteina koji se nalazi na položaju 797 receptora (Minari i sur., 2016.), dok etakrilna kiselina inhibira NKCC2 (Na-K-2Cl kotransporter) u uzlaznom dijelu Henleove petlje i makule dense. Uz to, inhibira izoenzime glutation-S-transferaze prekomjerno izražene u tumorskim tkivima (Somberg i Molnar, 2009.)

## **2 OBRAZLOŽENJE TEME**



Cilj ovog rada bio je ispitiati antibakterijsku aktivnost 12 spojeva sintetiziranih na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pritom je korištena metoda mikrodilucije koja se provodi u mikrotitarskim pločicama. U medij inokuliran određenom bakterijskom vrstom dodaju se testirani spojevi te se potom serijski razrjeđuju.

Sintetizirani spojevi derivati su itakonske kiseline i antimalarika primakina, klorokina i meflokina, kao i derivati itakonske kiseline i fluoroanilina, piridina i indola. Primarno su sintetizirani konjugati itakonske kiseline i primakina jer oni zasebno pokazuju nisku antikarcinogenu aktivnost prema staničnoj liniji MCF-7 adenokarcinoma. Različiti antimalarijski lijekovi također pokazuju izravno ili posredno djelovanje protiv raka, dok su supstituenti piridin, fluoroanilin i indol prisutni u nekim citostaticima (npr. sorafenib, imatinib, sunitinib) (Pavić i sur. 2014.; Perković i sur., 2016.; Pavić i sur., 2016., Verbaanderd i sur. 2016.)

Iako za ove spojeve nije predviđena antibakterijska aktivnost, važno je provesti opsežna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja potencijalnih novih lijekova jer se na taj način između ostalog mogu otkriti nova, nepredviđena djelovanja. Klonidin je dizajniran kao nazalni vazokonstriktor, ali je kliničkim pokusima dokazano da značajno snižava krvni tlak pa je registriran kao antihipertenziv. Tijekom potrage za novim lijekovima u liječenju tuberkuloze sintetizirani su brojni analozi izoniazida. Jedan od njih, iproniazid, nije pokazao značajno antituberkulozna djelovanje, ali je pokazao snažno antidepresivno djelovanje (Graham, 2013.). To su samo neki primjeri u kojima je razvoj lijeka završio u nepredviđenoj smjeru.

Danas se susrećemo s velikim javnoznanstvenim problemom rezistencije na antibiotike, odnosno povećanom incidencijom bolničkih i ne-bolničkih infekcija otpornim bakterijama. Potreba za novim antimikrobnim lijekovima je u stalnom porastu, a FDA je u zadnjih 40 godina odobrila samo 2 nove klase antibiotika. Zato je od iznimne važnosti povećati opseg antibakterijskih ispitivanja.

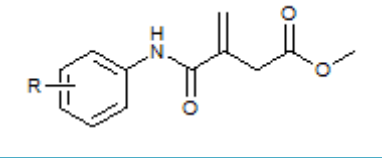
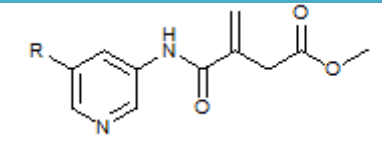
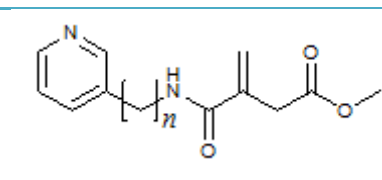
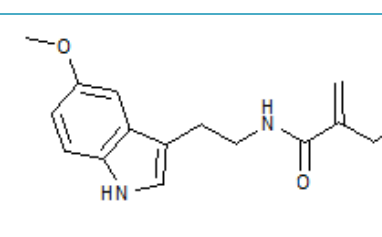
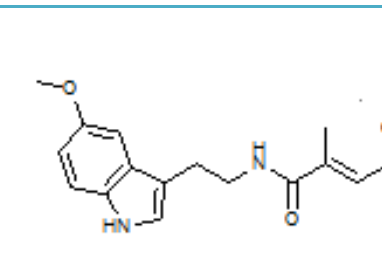
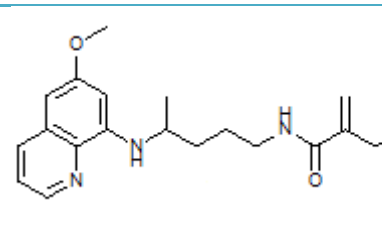
### **3 MATERIJALI I METODE**

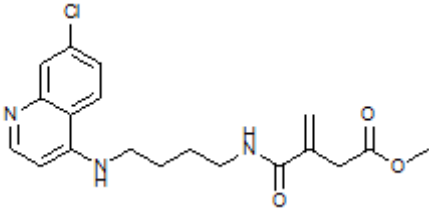
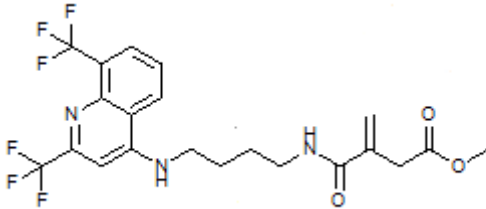
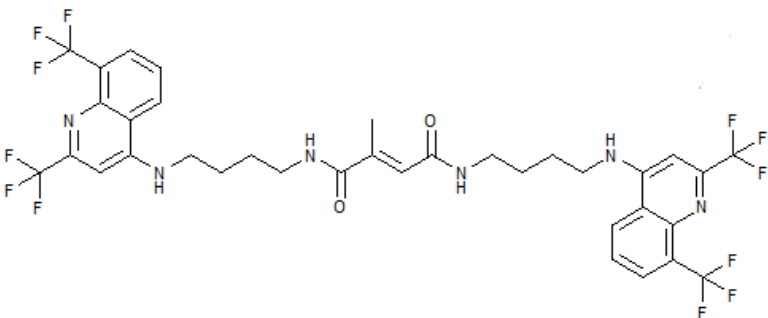
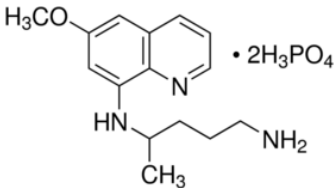
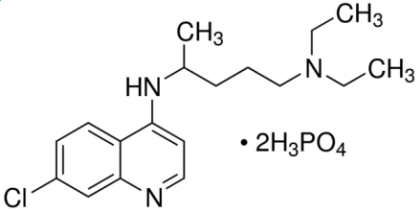
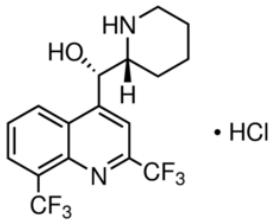
## 3.1 Materijali

### 3.1.1 Testirani spojevi

Ovim radom ispitano je ukupno 12 derivata itakonske kiseline, označenih kao V1, V2, V3, V4, V6, V7, V8, V9, MI3, MI5, MI7, MI9. U ispitivanje su uključeni i poznati spojevi, antimalarici: primakin bisfosfat, klorokin difosfat i meflokin hidroklorid kako bi se usporedilo djelovanje novih spojeva u odnosu na već postojeće.

Tabela 1 Kemijske strukture testiranih derivata itakonske kiseline

Spoj	Struktura
V1 (R= <i>p</i> -F)	
V2 (R= <i>m</i> -CF <sub>3</sub> )	
V3 (R= <i>p</i> -CF <sub>3</sub> )	
V4 (R=H)	
V6 (n=1)	
V7 (n=2)	
V8	
V9	
MI3	

MI5	
MI7	
MI9	
Primakin bisfosfat	
Klorokin difosfat	
Meflokin hidroklorid	

### 3.1.2 Mikroorganizmi

Antibakterijska aktivnost promatrana je na dva soja G+, te 2 soja G- bakterija: *Staphylococcus aureus* (G+), *Enterococcus faecalis* (G+), *Moraxella catarrhalis* (G-), *Escherichia coli* (G-). Radi se o hiperosjetljivom soju *E.coli* koji ne stvara efluks pumpe, TolC-Tn10.

### 3.1.3 Antibiotici i kemikalije

Antibiotik korišten kao kontrola pri ispitivanju osjetljivosti je azitromicin (USP Inc., SAD). Kao otapalo za sve spojeve korišten je dimetilformamid (DMF), osim za V4 za koji je korišten dimetil sulfoksid (DMSO).

*E. coli* i *S. aureus* uzgajani su na Mueller – Hinton agaru (Becton Dickinson, SAD), a *M. catarrhalis* i *E. faecalis* na Columbia agaru (Becton Dickinson, SAD) s 5 % ovčjom krvi (BIOSAP SO, BioGnost, Hrvatska).

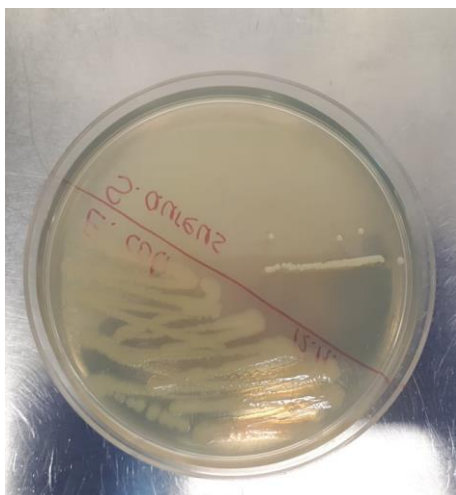
Za testiranje osjetljivosti mikrodilucijskom metodom korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica okrugloga dna. Bakterijske suspenzije koje se nanose na mikrotitarsku pločicu pripremljene su u inokulacijskoj podlozi, odnosno 0,85 % NaCl-u. Zamućenost je određivana pomoću Densimat fotometra.

## 3.2 Metode

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ispitivanih spojeva je određena metodom mikrodilucije, prema smjernicama CLSI-a.

Potencijalna antimikrobna svojstva ispitivana su na 4 vrste bakterija: *S. aureus* (G+), *E. faecalis* (G+), *M. catarrhalis* (G-), *E. coli* (G- , hiperosjetljiv soj bez efluks pumpi).

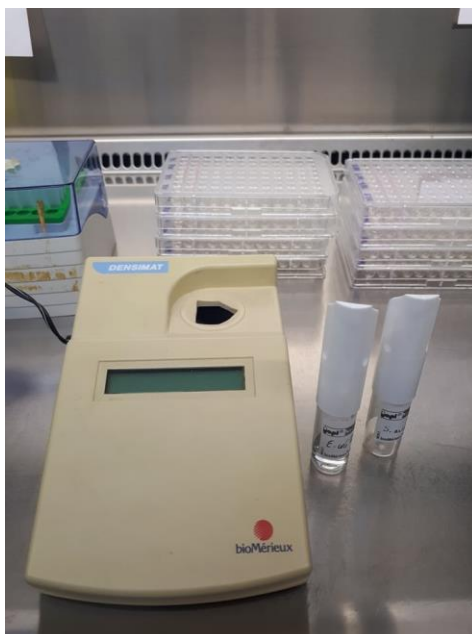
Prvo se trebaju uzgojiti bakterijske kulture. U tu svrhu su pripremljene hranjive podloge: Mueller-Hinton agar za *E. coli* i *S. aureus*, te Columbia agar s 5 % ovčje krvi za *E. faecalis* i *M. catarrhalis*. Odgovarajuća količina podloge u prahu se prema uputi proizvođača otopi u destiliranoj vodi, uz zagrijavanje i polagano miješanje. Otopljene podloge se steriliziraju u autoklavu na 120°C, pri tlaku od 1,2 atmosfere tijekom 20 minuta. Gotovi se medij inokulira bakterijama, inkubira u termostatu preko noći, a idućeg se dana bakterije presađuju na novi medij.



**Slika 7 Bakterijske kulture S.aureus i E.coli na Mueller-Hinton agaru**

Ispitivani spojevi otopljeni su u DMF-u, odnosno V4 u DMSO-u. Iz otopina spojeva se rade radne otopine koje moraju biti dvostruko veće koncentracije od željene najveće koncentracije u jažicama jer će se u njima dodatno razrijediti. Željena početna koncentracije za ispitivane spojeve je 256  $\mu\text{g/mL}$ , a za antibiotik azitromicin 32  $\mu\text{g/mL}$ .

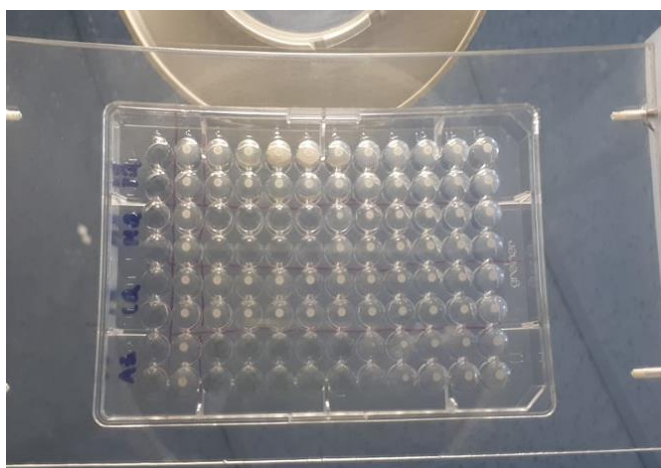
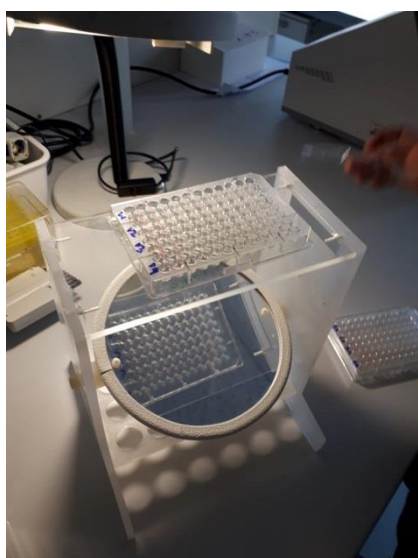
Bakterijski inokul pripravljen je od svježih bakterijskih kultura tako da se kolonije izravno suspendiraju u sterilnoj fiziološkoj otopini do gustoće od 0,5 McFarlanda (ekvivalentno  $1-2 \times 10^8$  stanica/mL). Bakterijska suspenzija se konačno razrjeđuje 100 puta u podlozi.



**Slika 8 Densimat fotometar, uređaj kojim je određena zamućenost bakterijske suspenzije u fiziološkoj otopini. Željena zamućenost je 0,5 McFarlanda (ekvivalentno  $1-2 \times 10^8$  stanica/mL).**

Samo ispitivanje mikrodilucijskom metodom se provodi u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica okruglog dna. Pritom se prvi stupac puni čistom hranjivom podlogom i služi kao negativna kontrola, odnosno kontrola sterilnosti. Drugi stupac sadrži hranjivu podlogu i bakterijski inokul te služi kao pozitivna kontrola, odnosno kontrola rasta. U sve ostale stupce (osim trećeg) također se unose 50  $\mu\text{L}$  hranjive podloge. Spojevi se testiraju u duplikatu dvostrukim razrjeđenjem tako da se treći stupac napuni sa 100  $\mu\text{L}$  radne otopine, a zatim se 50  $\mu\text{L}$  prenosi u sljedeće redove jažica. 50  $\mu\text{L}$  iz zadnje jažice se odbaci. U dobivene otopine ispitivanih tvari dodaje se još po 50  $\mu\text{L}$  bakterijskog inokula. Konačni raspon koncentracija supstanci je od 256  $\mu\text{g/mL}$  do 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Nasađene pločice inkubiraju se na 37°C preko noći (18-22 sata). Rezultati se očitaju vizualnom metodom. Najmanja koncentracija ispitivanog spoja (u  $\mu\text{g/mL}$ ) pri kojoj ne vidimo bakterijski rast je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK).



**Slika 9 Vizualno određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kao najmanje koncentracije pri kojoj nije zabilježen bakterijski rast**

## **4    REZULTATI I RASPRAVA**



**Tabela 2 Minimalne inhibitorne koncentracije derivata itakonske kiseline i anilina za sojeve bakterija *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. catarrhalis*, *E. coli***

MIK (ug/mL)				
spoj	<i>S. aureus</i> ATCC 13709	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>M.</i> <i>catarrhalis</i> ATCC 23246	<i>E. coli</i> TolC-Tn10
V1	>256	>256	16	256
V2	256	>256	16	256
V3	256	>256	16	256
<b>azitromicin</b>	2	8	≤0.06	0,5

Rezultati eksperimenta pokazuju da je antimikrobna aktivnost svih derivata itakonske kiseline i anilina jednaka. Spoj V1 derivat je itakonske kiseline i fluoroanilina, V2 je derivat itakonske kiseline i m-trifluorometilanilina, dok je V3 derivat itakonske kiseline i p-trifluorometilanilina. Niti jedan od spojeva nije pokazao aktivnost na bakterijama *S. Aureus*, *E. Faecalis* i *E.coli*, dok su značajni učinak pokazali na *M. catarrhalis* (MIK = 16 µg/mL).

**Tabela 3 Minimalne inhibitorne koncentracije derivata itakonske kiseline i piridina za sojeve bakterija *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. catarrhalis*, *E. coli***

MIK (ug/mL)				
spoj	<i>S. aureus</i> ATCC 13709	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>M.</i> <i>catarrhalis</i> ATCC 23246	<i>E. coli</i> TolC-Tn10
V4	>256	>256	16	>256
V6	>256	>256	64	>256
V7	>256	>256	32/16	256
<b>azitromicin</b>	2	8	≤0.06	0,5

Na temelju rezultata eksperimenta može se zaključiti kako niti derivati itakonske kiseline i piridina ne pokazuju učinak na bakterijskim sojevima *S. Aureus*, *E. Faecalis* i *E.coli*. Spojevi su ostvarili antibakterijski učinak na *M. catarrhalis*, a najbolji učinak pokazao je spoj V4 (MIK = 16 µg/mL). Produljenjem alifatskog lanca itakonske kiseline kod spojeva V6 i V7 učinak se smanjio.

**Tabela 4 Minimalne inhibitorne koncentracije derivata itakonske kiseline i indola za sojeve bakterija *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. catarrhalis*, *E. coli***

MIK (ug/mL)				
spoj	<i>S. aureus</i> ATCC 13709	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	<i>E. coli</i> TolC-Tn10
<b>V8</b>	>256	>256	16	256
<b>V9</b>	256	>256	32	>256
<b>azitromicin</b>	2	8	≤0.06	0,5

Spoj V8 derivat je itakonske kiseline i indola, dok je spoj V9 derivat itakonske kiseline i dvije molekule indola. Niti ovi spojevi nisu pokazali učinak na bakterijskim sojevima *S. Aureus*, *E. Faecalis* i *E.coli*, a bolji antimikrobni učinak na *M. catarrhalis* pokazao je spoj V8 (MIK = 16 µg/mL).

**Tabela 5 Minimalne inhibitorne koncentracije antimalarika primakina, klorokina i meflokina te MIK-ovi derivata itakonske kiseline i primakina, klorokina te meflokina za sojeve bakterija *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. catarrhalis*, *E. coli***

MIK (ug/mL)				
spoj	<i>S. aureus</i> ATCC 13709	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	<i>E. coli</i> TolC-Tn10
<b>MI 3</b>	>256	>256	4	>256
<b>MI 5</b>	>256	256	16	64
<b>MI 7</b>	>256	>256	64	>256
<b>MI9</b>	>256	>256	>256	>256
<b>PQ (primakin bisfosfat)</b>	>256	>256	32	>256
<b>CQ (klorokin difosfat)</b>	>256	>256	>256	>256
<b>MQ (meflokin hidrokloride)</b>	32	16	0.5	8
<b>azitromicin</b>	2	8	≤0.06	0,5

Spoj MQ (meflokin hidroklorid) jedini je pokazao učinak na svim ispitivanim bakterijskim sojevima. Derivat itakonske kiseline i klorokina (MI5) pokazao je antibakterijski učinak na *M. catarrhalis* i *E.coli*, CQ (klorokin) i MI9 (derivat itakonske kiseline i meflokina)

nije pokazao aktivnost niti na jednome bakterijskome soju, dok su ostali spojevi pokazali učinak samo na *M. catarrhalis*. Najbolju inhibiciju rasta *M. catarrhalis* ostvario je meflokin (MIK= 0,5 µg/mL) , a od novosintetiziranih spojeva MI3 (MIK = 4 µg/mL) koji je derivat itakonske kiseline i primakina.

Općenito, rezultati eksperimenta pokazuju da ja za sve ispitivane spojeve, osim meflokin hidroklorida (MIK = 32 µg/mL), minimalna inhibitorna koncentracija za bakterijski soj *S. aureus* veća od 256 µg/mL. Usporedbom s minimalnom inhibitornom koncentracijom antibiotika azitromicina koja iznosi 2 µg/mL, može se zaključiti da spojevi nemaju učinak na inhibiciju rasta bakterijskog soja *S. aureus*. Gotovo jednake rezultate imamo i za bakterijske sojeve *E. faecalis* i *E. coli*.

Najbolji učinak inhibicije rasta spojevi su pokazali na *M. catarrhalis*. Najbolji antibakterijski učinak pokazao je MQ (MIK = 0,5-1 µg/mL), zatim MI3 (MIK = 4 µg/mL). Značajniji učinak inhibicije bakterijskog rasta su pokazali i spojevi V1, V2, V3, V4, V8, MI5 (MIK = 16 µg/mL). Spojevi MI9 i CQ, za koje je MIK veća od 256 µg/mL, uzeto je da nemaju antibakterijski učinak, te nisu razmatrani u Tabeli 5.

**Tabela 6 Molekulske formule, logP vrijednosti i MIK-ovi ispitivanih spojeva na *M. catarrhalis***

Spoj	Molekulska formula	logP	MIK (µg/mL)
<b>V1</b>	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> FNO <sub>3</sub>	1.78	16
<b>V2</b>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	2.51	16
<b>V3</b>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	2.51	16
<b>V4</b>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.42	16
<b>V6</b>	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.12	64
<b>V7</b>	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.41	32/16
<b>V8</b>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1.57	32
<b>V9</b>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	2.79	4
<b>MI3</b>	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	1.88	16
<b>MI5</b>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	2.23	64
<b>PQ</b>	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O	2.1	32
<b>MQ</b>	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	3.9	1/0,5
<b>azitromicin</b>	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	3.03	<0,06

Lipofilnost nekog spoja govori o njegovoj mogućnosti prolaska kroz staničnu membranu, utječe na apsorpciju i transport, vezanje lijeka na receptor, nakupljanje u masnom tkivu, prolazak kroz krvno moždanu barijeru. Jedan od parametra lipofilnosti je koeficijent razdjeljenja (P) koji predstavlja omjer ravnotežnih koncentracija ispitivanog spoja u organskoj fazi (n-oktanol) i vodenoj fazi (pufer pH = 7,4). Hansch i suradnici su predložili da se hidrofobna (lipofilna) svojstva molekula opišu logaritmom koeficijenta razdjeljenja (log P) (Lipinski i sur., 1997.).

$$\log(P) = \log \frac{C}{C_w}$$

*C* = ravnotežna molarna koncentracija ispitivanog spoja u organskoj fazi

*C<sub>w</sub>* = ravnotežna molarna koncentracija ispitivanog spoja u vodenoj fazi

Utvrđeno je da je lipofilni karakter spojeva važan parametar povezan s mogućnošću prelaska membrane, a mnogi procesi dispozicije lijekova ovise upravo o tome. Štoviše, mnogi proteini uključeni u dispoziciju lijekova imaju hidrofobno vezno mjesto pa je lipofilnost još važnija (Ansari, 2009.). Zato je u Tablici 2 prikazan je odnos lipofilnosti, odnosno logP te antibakterijske aktivnosti na *M. catarrhalis*. Spojevi koji imaju najbolju antibakterijsku aktivnost, su ujedno i oni najveće vrijednosti logP. To je opažanje u skladu s prethodnim ispitivanjima koja su pokazala povećanu osjetljivost *M. catarrhalis* prema hidrofobnim spojevima zbog karakterističnih svojstava membrane (Gotoh i sur., 1989.). *M. catarrhalis* na svojoj površini sadrži lipopolisaharide male molekularne mase (LPS), koji se također nazivaju lipooligosaharidi (LOS). Oni doprinose povećanoj hidrofobnosti vanjske membrane bakterije. Druga ispitivana gram-negativna bakterija, *E.coli*, ima različitu strukturu vanjske membrane te sadrži manje hidrofobne LPS (Tsujimoto i sur., 1999.). Zato *M. catarrhalis* ima staničnu membranu s većom propusnošću za lipofilne agense, omogućujući veći stanični unos i pojačano unutarstanično djelovanje.

## **5 ZAKLJUČCI**

1. Ispitivani derivati itakonske kiseline nisu pokazali učinak inhibicije rasta gram-pozitivnih bakterija *S. aureus* i *E. faecalis* te gram-negativne bakterije *E. coli*.
2. Značajniji učinak inhibicije rasta ispitivani su spojevi pokazali na gram-negativnoj bakteriji *M. catarrhalis*. Najpotentniji spoj je već postojeći antimalarik MQ (meflokin) čija minimalna inhibitorna koncentracija iznosi 1/0,5 µg/mL. Od novosintetiziranih spojeva najbolji učinak inhibicije bakterijskog rasta pokazao je spoj V9 (MIK = 4 µg/mL).
3. Usporedbom s kontrolom, antibiotikom azitromicinom (MIK = 0,06 µg/mL), vidi se da je učinak najpotentnijeg od ispitivanih spojeva 8 – 16 puta manji u odnosu na postojeći antibiotik. Ipak, ovakva saznanja o potencijalnoj antibakterijskoj aktivnosti mogu dovesti do dodatne modifikacije strukture spoja i time povećanja njegovog učinka.
4. Minimalne inhibitorne koncentracije spojeva povezane su s njihovom lipofilnosti. Kao jedan od parametara lipofilnosti uzet je logP te se pokazalo da je antibakterijski učinak spojeva na *M. catarrhalis* veći što je veća vrijednost logP. Razlog tome je hidrofobnost bakterijske membrane zbog prisutnih lipooligosaharida. Spojevi nisu pokazali učinak na *E. coli*, iako i ta bakterija ima prisutne lipopolisaharide na vanjskoj membrani, no oni su manje lipofilni te je manja penetracija spojeva u samu bakteriju.

## **6 LITERATURA**

Ansari K.F., Lal C. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial activity of some new benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2009), 10, 4028-4033

Ariëns E. J., *Medicinal Chemistry: A Series of Monographs*. New York, Academic Press, 1975., str. 42-44.

Babić O. Karakterizacija zemljišnih cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema planinskih područja Republike Srbije, doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2018.

Balouiri Mounyr, Moulay Sadiki, Saad Koraichi I. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6 (2016) 71–79.

Blass Benjamin E. *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. Cambridge, Academic Press, 2015., str. 1 - 86.

Botox, Sažetak opisa svojstava lijeka. Odobrio HALMED 2019. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Botox-100-Allergan-jedinica-prasak-za-otopinu-za-injekciju/12189/> (pristup 23.4.2020.)

Cooper G, Hausman RE. *Stanica: Molekularni pristup*, peto izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2010., str. 33-36.

Cooper S.J., Gaba and endorphin mechanisms in relation to the effects of benzodiazepines on feeding and drinking. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 7 (1983) 495-503.

Cordes T., Michelucci A., Hiller K. Itaconic acid: The surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite. *Annu. Rev. Nutr.* 2015, 35, 451–473.

Daly J.W., Garraffo H.M., Spande T.F. Alkaloids from Amphibian Skins. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, 1999., str. 96.

Dayeh VR, Bols NC, Tanneberger K, Schirmer K, Lee LE. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants: an update following OECD's fish toxicity testing framework No. 171. *Curr Protoc Toxicol*, 2013, 1, 43-84.

Denes É. and Hidri N. Synergie et Antagonisme en Antibiothérapie. *Antibiotiques*, 11 (2009), 106-115

Discovery and development of ACE inhibitors, [https://en.wikipedia.org/wiki/Discovery\\_and\\_development\\_of\\_ACE\\_inhibitors](https://en.wikipedia.org/wiki/Discovery_and_development_of_ACE_inhibitors), pristup: 20.5.2020.



Finger S., Wiegand C., Buschmann H.J. Antibacterial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. *International Journal of Pharmaceutics* 452 (2013),188-193

Gibbs J.B., Pompliano D.L., Mosser S.D., Rands E., Lingham R.B., Singh S.B., Scolnick E.M., Kohl N.E., Oliff A. Selective inhibition of farnesyl-protein transferase blocks Ras processing in vivo. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 7617–7620.

Gotoh N., Tanaka S., Nishino T. Supersusceptibility to hydrophobic antimicrobial agents and cell surface hydrophobicity in *Branhamella catarrhalis*. *FEMS Microbiology Letters* (1989), 1–2, 211-213

Graham L. Patrick *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford, Oxford University Press, 2013., str. 189 - 215.

Hudzicki J., Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology (2009.).

Hamamoto T.; Seto H.; Beppu T. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* 1983, 36, 646–650.

Hausdorfer J., Sompek E., Allerberger F. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2 (1998), 751-755

Itakonska kiselina, [https://sh.wikipedia.org/wiki/Itakonska\\_kiselina](https://sh.wikipedia.org/wiki/Itakonska_kiselina), pristup 7.4.2020.

Katzung Bertram G. *Basic & Clinical Pharmacology*. New York, McGraw-Hill Education, 2018., str. 1-20.

Kudo N., Matsumori N., Taoka H., Fujiwara D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M.; Horinouchi, S. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 9112–9117.

Kreger B.E., Craven D.E. and McCabe W.R. Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *The American Journal of Medicine* 68 (1980), 344-345

Lemke Thomas L., Williams David A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 2013., str. 13-29, 268-283.

Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery reviews* 23 (1997) 3-25

Morfin, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Morfin>, pristup 20.4.2020.

Moos W.H The Intersection of Strategy and Drug Research. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2007., 1-84

Minari R., Bordi P., Tiseo M. Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer: review on emerged mechanisms of resistance. *Transl Lung Cancer Res.* 2016, 5, 695–708

Nijs A., Cartuyvels R. , Mewis A. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (2003), 3627-3630

Pavić K., Perković I., Cindrić M., Pranjić M., Martin-Kleiner I., Kralj M., Schols D., Hadjipavlou-Litina D., Katsori A.-M., Zorc B. Novel semicarbazides and ureas of primaquine with bulky aryl or hydroxyalkyl substituents: Synthesis, cytostatic and antioxidative activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 86, 502-514.

Pavić K., Perković I., Gilja P., Kozlina F., Ester K., Kralj M., Schols D., Hadjipavlou-Litina, D., Pontiki E., Zorc, B. Design, synthesis and biological evaluation of novel primaquine-cinnamic acid conjugates of amide and acylsemicarbazide type. *Molecules* 2016, 21, 1629–1653.

Paparella A., Taccogna L., Aguzzi I. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control.*, 19 (2008), 1174-1182

Perković I., Antunović M. Marijanović I., Pavić K., Ester K., Kralj M., Vlainić J., Kosalec I., Schols D., Hadjipavlou-Litina D., Pontiki E., Zorc B. Novel urea and bis-urea primaquine derivatives with hydroxyphenyl and halogenphenyl substituents: synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 124, 622–636.

Pfaller M.A., Sheehan D.J., Rex J.H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Reviews* 17 (2004), 268-280

Procop Gary W., Church Deirdre I., Hall Geraldine S., Janda William M., Schreckenberger Paul C., Woods Gail I. Koneman Elmer W. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Wolters Kluwer, 2017., str 983 – 1094.

Rajić Z. Odabrana poglavlja farmaceutske kemije, interna skripta. Zagreb, Farmaceutsko – biokemijski fakultet.

Sandle Tim, *Pharmaceutical Microbiology : Essentials for Quality Assurance and Quality Control*. Elsevier Ltd., 2016., str. 103-113, 171-183.

Somberg J.C., Molnar J. The pleiotropic effects of ethacrynic acid. *Am. J. Ther.* 2009, 16, 102–104.

Tsujimoto H., Gotoh N., Nishino T. Diffusion of macrolide antibiotics through the outer membrane of *Moraxella catarrhalis*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 1999, 196-200

Verbaanderd C., Maes H.; Schaaf M.B., Sukhatme V.P., Pantziarka P., Sukhatme V., Agostinis P., Bouche G. Repurposing drugs in oncology (ReDO) – chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *eCancer* 2017, 11, Article ID 781.

White R.L., Burgess D.S., Manduru M. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy : time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (1996), 1914-1918

Yousef A.E., Courtney P.D. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. Yousef A.E., Juneja V.K., *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, CRC Press, Washington DC (2003), str. 2-8

Zerkowski J.A.; Solaiman; D.K.Y. 2-Fatty acrylic acids: New highly derivatizable lipophilic platform molecules. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2014, 91, 1225–1233.

## 7 SAŽETAK/SUMMARY

Marina Kučica

### Određivanje antibakterijske aktivnosti derivata itakonske kiseline

Proces otkrića lijekova obuhvaća sljedeće faze: odabir bolesti, odabir cilja na koji lijek djeluje, identificiranje biološkog testa, pronalazak spoja uzora. Jedan od *in vivo* testova koji se provodi u ovom kontekstu je i ispitivanje antibakterijske aktivnosti. U ovom je radu ispitivana antibakterijska aktivnost 12 novosintetiziranih spojeva na 4 vrste bakterija: *S. aureus* (G+), *E. faecalis* (G+), *M. catarrhalis* (G-), *E. coli* (G- , hiperosjetljiv soj bez efluks pumpi). Pritom je korištena metoda mikrodilucije koja se provodi u mikrotitarskim pločicama. U medij inokuliran određenom bakterijskom vrstom dodaju se testirani spojevi te se potom serijski razrjeđuju. Sintetizirani spojevi derivati su itakonske kiseline i antimalarika primakina, klorokina i meflokina, kao i derivati itakonske kiseline i fluoroanilina, piridina i indola. Iako za ove spojeve nije predviđena antibakterijska aktivnost, važno je provesti opsežna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja potencijalnih novih lijekova jer se na taj način mogu otkriti nova, nepredviđena djelovanja. Ispitivani derivati itakonske kiseline nisu pokazali učinak inhibicije rasta gram-pozitivnih bakterija *S. aureus* i *E. faecalis* te gram-negativne bakterije *E. coli*. Značajniji učinak inhibicije rasta ispitivani su spojevi pokazali na gram-negativnoj bakteriji *M. catarrhalis*. Najpotentniji spoj je već postojeći antimalarik MQ (meflokin) čija minimalna inhibitorna koncentracija iznosi 1/0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Od novosintetiziranih spojeva najbolji učinak inhibicije bakterijskog rasta pokazao je spoj V9 (MIK = 4  $\mu\text{g/mL}$ ). Minimalne inhibitorne koncentracije spojeva povezane su s njihovom lipofilnosti. Kao jedan od parametara lipofilnosti uzet je logP te se pokazalo da je antibakterijski učinak spojeva na *M. catarrhalis* veći što je veća vrijednost logP. Razlog tome je hidrofobnost bakterijske membrane zbog prisutnih lipooligosaharida. Spojevi nisu pokazali učinak na *E. coli*, iako i ta bakterija ima prisutne lipopolisaharide na vanjskoj membrani, no oni su manje lipofilni te je manja penetracija spojeva u samu bakteriju.

Ključne riječi: derivati itakonske kiseline, metoda mikrodilucije, otkriće lijekova

Marina Kučica

## Determining antibacterial activity of itaconic acid derivatives

Drugs discovery process includes the following stages: selection of disease, selection of drug target, identifying biological test, discovery of model compound. One of *in vivo* tests applied in this context is antibacterial activity testing. In this paper, the antibacterial activity of 12 newly synthesized compounds was tested against 4 species of bacteria: *S. aureus* (G+), *E. faecalis* (G+), *M. catarrhalis* (G-), *E. coli* (G-, hypersensitive strain without efflux pumps). On this occasion, microdilution method was applied, which is implemented using microtiter plates. The tested compounds were added to a medium inoculated by certain species of bacteria and then sequentially diluted. The synthesized compounds are derivatives of itaconic acid and anti-malarial drugs: primaquine, chloroquine and mefloquine, as well as the derivatives of itaconic acid and fluoroaniline, pyridine and indole. Although no antibacterial activity is envisaged for these compounds, it is important to conduct extensive *in vitro* and *in vivo* testing of potential new drugs, since in this way it is possible to detect new, unforeseen effects. The examined itaconic acid derivatives did not show growth inhibition effect on gram-positive bacteria *S. aureus* and *E. faecalis*, or on gram-negative bacteria *E. coli*. The examined compounds showed substantial growth inhibition effect on the gram-negative bacteria *M. catarrhalis*. The most potent compound is the already existing anti malaria drug MQ (mefloquine) with the minimum inhibitory concentration of 1/0.5 µg/mL. Out of the newly-synthesized compounds, V9 (MIC = 4 µg/mL) compound showed the best bacterial growth inhibition effect. Minimum inhibitory compound concentrations are related to their lipophilicity. Upon selecting logP as one of lipophilicity parameters, it was evident that antibacterial effect of the compounds on *M. catarrhalis* increased with the increase in the logP value. The reason for this is the hydrophobicity of bacterial membrane due to the presence of lipooligosaccharides. The compounds showed no effect on *E. coli*, although even that bacteria species has lipopolysaccharides present in the outer membrane, however as they are less lipophilic the penetration of compounds in the very bacteria is smaller.

Key words: itaconic acid derivatives, microdilution method, drugs discovery

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI DERIVATA ITAKONSKE KISELINE

Marina Kučica

### SAŽETAK

Proces otkrića lijekova obuhvaća sljedeće faze: odabir bolesti, odabir cilja na koji lijek djeluje, identificiranje biološkog testa, pronalazak spoja uzora. Jedan od *in vivo* testova koji se provodi u ovom kontekstu je i ispitivanje antibakterijske aktivnosti. U ovom je radu ispitivana antibakterijska aktivnost 12 novosintetiziranih spojeva na 4 vrste bakterija: *S. aureus* (G+), *E. faecalis* (G+), *M. catarrhalis* (G-), *E. coli* (G- , hiperosjetljiv soj bez efluks pumpi). Pritom je korištena metoda mikrodilucije koja se provodi u mikrotitarskim pločicama. U medij inokuliran određenom bakterijskom vrstom dodaju se testirani spojevi te se potom serijski razrijeđuju. Sintetizirani spojevi derivati su itakonske kiseline i antimalarika primakina, klorokina i meflokin, kao i derivati itakonske kiseline i fluoroanilina, piridina i indola. Iako za ove spojeve nije predviđena antibakterijska aktivnost, važno je provesti opsežna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja potencijalnih novih lijekova jer se na taj način mogu otkriti nova, nepredviđena djelovanja. Ispitivani derivati itakonske kiseline nisu pokazali učinak inhibicije rasta gram-pozitivnih bakterija *S. aureus* i *E. faecalis* te gram-negativne bakterije *E. coli*. Značajniji učinak inhibicije rasta ispitivani su spojevi pokazali na gram-negativnoj bakteriji *M. catarrhalis*. Najpotentniji spoj je već postojeći antimalarik MQ (meflokin) čija minimalna inhibitorna koncentracija iznosi 1/0,5 µg/mL. Od novosintetiziranih spojeva najbolji učinak inhibicije bakterijskog rasta pokazao je spoj V9 (MIK = 4 µg/mL). Minimalne inhibitorne koncentracije spojeva povezane su s njihovom lipofilnosti. Kao jedan od parametara lipofilnosti uzet je logP te se pokazalo da je antibakterijski učinak spojeva na *M. catarrhalis* veći što je veća vrijednost logP. Razlog tome je hidrofobnost bakterijske membrane zbog prisutnih lipooligosaharida. Spojevi nisu pokazali učinak na *E. coli*, iako i ta bakterija ima prisutne lipopolisaharide na vanjskoj membrani, no oni su manje lipofilni te je manja penetracija spojeva u samu bakteriju.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 9 grafičkih prikaza, 6 tablica, 44 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: derivati itakonske kiseline, metoda mikrodilucije, otkriće lijekova

Mentor: Dr. sc. Karmela Barišić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: Dr. sc. Karmela Barišić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of medical biochemistry and haematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### DETERMINING ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ITACONIC ACID DERIVATIVES

Marina Kučica

#### SUMMARY

Drugs discovery process includes the following stages: selection of disease, selection of drug target, identifying biological test, discovery of model compound. One of *in vivo* tests applied in this context is antibacterial activity testing. In this paper, the antibacterial activity of 12 newly synthesized compounds was tested against 4 species of bacteria: *S. aureus* (G+), *E. faecalis* (G+), *M. catarrhalis* (G-), *E. coli* (G-, hypersensitive strain without efflux pumps). On this occasion, microdilution method was applied, which is implemented using microtiter plates. The tested compounds were added to a medium inoculated by certain species of bacteria and then sequentially diluted. The synthesized compounds are derivatives of itaconic acid and anti-malarial drugs: primaquine, chloroquine and mefloquine, as well as the derivatives of itaconic acid and fluoroaniline, pyridine and indole. Although no antibacterial activity is envisaged for these compounds, it is important to conduct extensive *in vitro* and *in vivo* testing of potential new drugs, since in this way it is possible to detect new, unforeseen effects. The examined itaconic acid derivatives did not show growth inhibition effect on gram-positive bacteria *S. aureus* and *E. faecalis*, or on gram-negative bacteria *E. coli*. The examined compounds showed substantial growth inhibition effect on the gram-negative bacteria *M. catarrhalis*. The most potent compound is the already existing anti malaria drug MQ (mefloquine) with the minimum inhibitory concentration of 1/0.5 µg/mL. Out of the newly-synthesized compounds, V9 (MIC = 4 µg/mL) compound showed the best bacterial growth inhibition effect. Minimum inhibitory compound concentrations are related to their lipophilicity. Upon selecting logP as one of lipophilicity parameters, it was evident that antibacterial effect of the compounds on *M. catarrhalis* increased with the increase in the logP value. The reason for this is the hydrophobicity of bacterial membrane due to the presence of lipooligosaccharides. The compounds showed no effect on *E. coli*, although even that bacteria species has lipopolysaccharides present in the outer membrane, however as they are less lipophilic the penetration of compounds in the very bacteria is smaller.

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

Thesis includes: 43 pages, 9 figures, 6 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: itaconic acid derivatives, microdilution method, drugs discovery

Mentor: Karmela Barišić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: