

Derivati harmina kao potencijalni inhibitori bakterijskog biofilma

Kapović, Katja

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:163:916342>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-04**



Repository / Repozitorij:

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



Katja Kapović

**Derivati harmina kao potencijalni inhibitori
bakterijskog biofilma**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutska kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Zrinke Rajić.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Zrinki Rajić na svoj pruženoj pomoći tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Puno hvala Marini Marinović na strpljenju i pomoći tijekom rada u laboratoriju. Hvala mojim roditeljima, sestri i prijateljima koji su bili uz mene tijekom ovih pet godina fakulteta.

Rad je financiran sredstvima uspostavnog istraživačkog projekta *Derivati harmina kao potencijalni antimalarici* (UIP-2017-05-5160) Hrvatske zaklade za znanost.



KRATICE

^{13}C NMR	^{13}C nuklearna magnetska rezonancija
^1H NMR	^1H nuklearna magnetska rezonancija
ACN	acetonitril
AHL	<i>N</i> -acil homoserin lakton
AI-2	autoinduktor-2
AIP	autoinducirajući peptid
BHL	<i>N</i> -butanoil-L-homoserin lakton
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
c-di-AMP	ciklički dimerni adenzin monofosfat
c-di-GMP	ciklički dimerni gvanozin monofosfat
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DPD	4,5-dihidroksi-2,3-pentadion
eDNA	ekstracelularna deoksiribonukleinska kiselina
EPS	izvanstanične polimerne tvari (engl. <i>extracellular polymeric substances</i> , EPS)
HATU	1-(bis(dimetilamino)metilen)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo(4,5- <i>b</i>)piridinijev 3-oksidi heksafluorofosfat
HSL	homoserinski lakton
IR	infracrvena spektroskopija
MS	masena spektrometrija
MTAN	5-metiltioadenozin nukleozidaza
n.o.	nije određeno
n.s.	nije snimljeno
OdDHL	<i>N</i> -(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton
QQ	<i>quorum quenching</i>
QS	<i>quorum sensing</i>
s.t.	sobna temperatura
SAM	<i>S</i> -adenozil metionin
SRH	<i>S</i> -ribozil-L-homocistein

TFA	trifluorooktana kiselina
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
t_i	temperatura tališta

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Biofilm	3
1.1.1. Stvaranje biofilma.....	4
1.1.2. Značajke biofilma	5
1.1.3. Uzroci rezistencije na antibiotike.....	5
1.2. Inhibicija biofilma	6
1.2.1. Inhibicija adhezije.....	6
1.2.2. EPS.....	6
1.2.2.1. Inhibicija sinteze EPS-a.....	7
1.2.2.2. Dispergiranje matriksa	8
1.2.3. Stanična komunikacija (engl. <i>quorum sensing</i> , QS).....	9
1.2.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.2.3.2. Inhibitori QS	15
1.2.4. Metabolička interferencija.....	18
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Sintaza metil 3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)propanoata (1).....	22
3.2. Sintaza 3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)propanske kiseline (2)	23
3.3. Sintaza amida (3-5).....	24
3.3.1. <i>Tert</i> -butil 4-(3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)propanamido)piperidin-1-karboksilat (3)	24
3.3.2. <i>Tert</i> -butil (1-(3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)propanoil)piperidin-4-il)karbamat (4).....	25
3.3.3. <i>Tert</i> -butil (2-(3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)propanamido)etil)karbamat (5)	26
3.4. Uklanjanje Boc zaštitne skupine i dobivanje amida (6-8).....	26
3.4.1. 3-(7-Metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)- <i>N</i> -(piperidin-4-il)propanamid (6).....	27
3.4.2. 1-(4-Aminopiperidin-1-il)-3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)propan-1-on (7)	28
3.4.3. <i>N</i> -(2-aminoetil)-3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)propanamid (8).....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
5. ZAKLJUČAK.....	38

6. LITERATURA	40
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	45
8. PRILOZI	50
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Zbog razvoja rezistencije na antibiotike infektivne bolesti su i dalje značajan uzrok smrti u svijetu. Naime, mete na koje antibiotici djeluju odgovorne su za rast bakterijske stanice (sinteza proteina, sinteza stanične membrane, replikacija DNA) što posljedično dovodi do selekcije onih bakterija u populaciji kod kojih se dogodila mutacija, odnosno koje su postale rezistentne (Rasko i Sperandio, 2010). Kod bakterija se često mogu uočiti mutacije, zbog velikog broja bakterijskih stanica. Mutacije se dalje prenose horizontalnim transferom gena čime se povećava broj rezistentnih bakterija. Kako je bakterijama u interesu preživljavanje, izgledno je da će se u nekom trenutku razviti otpornost naspram antibiotika, stoga su nove strategije u borbi protiv bakterija usmjerene na faktore virulencije. Faktori virulencije su bakterijski produkti koji promoviraju bolest oštećenjem domaćina ili izbjegavanjem imunološkog sustava te kao takvi nisu nužni za preživljavanje bakterijske stanice, zbog čega se rezistencija rjeđe javlja (Dickey i sur., 2017). Faktori virulencije su brojni, a među njima se ističu adhezini, toksini, siderofori koji keliraju željezo, posebni sekrecijski sustavi za dostavljanje efektor (npr. toksina), stvaranje biofilma. Kako je proizvodnja navedenih faktora metabolički "skupa", važna je precizna regulacija ekspresije gena kako bi se faktori virulencije pojavili tek na mjestu kolonizacije (Majik i Parvatkar, 2014; Rasko i Sperandio, 2010).

Posebno atraktivna meta je stvaranje biofilma, koji se smatra ključnim faktorom u razvoju kroničnih infekcija (Römling i Balsalobre, 2012). Usto, biofilm se formira na medicinskim uređajima, na kontaktnim lećama te na plastičnim i metalnim površinama što ga čini i velikim industrijskim problemom. Naime, bakterije mogu postojati u sesilnom obliku kao dio biofilma ili u planktonskom obliku, pri čemu se fiziologija stanica u ova dva oblika jako razlikuje (De Kievit, 2019). Uništenje biofilma otežano je zbog njegove kompleksne strukture koja onemogućava prodiranje antibiotika, zbog toga što često obuhvaća različite bakterijske populacije što implicira upotrebu različitih antibiotika te zbog činjenice da bakterije koje su dio biofilma slabije aktiviraju imunološki sustav od planktonskog oblika. Navedene karakteristike biofilma pokazale su da bi se terapija trebala usmjeriti na istovremeno ciljanje više različitih meta (Koo i sur., 2017; Veerachamy i sur., 2014).

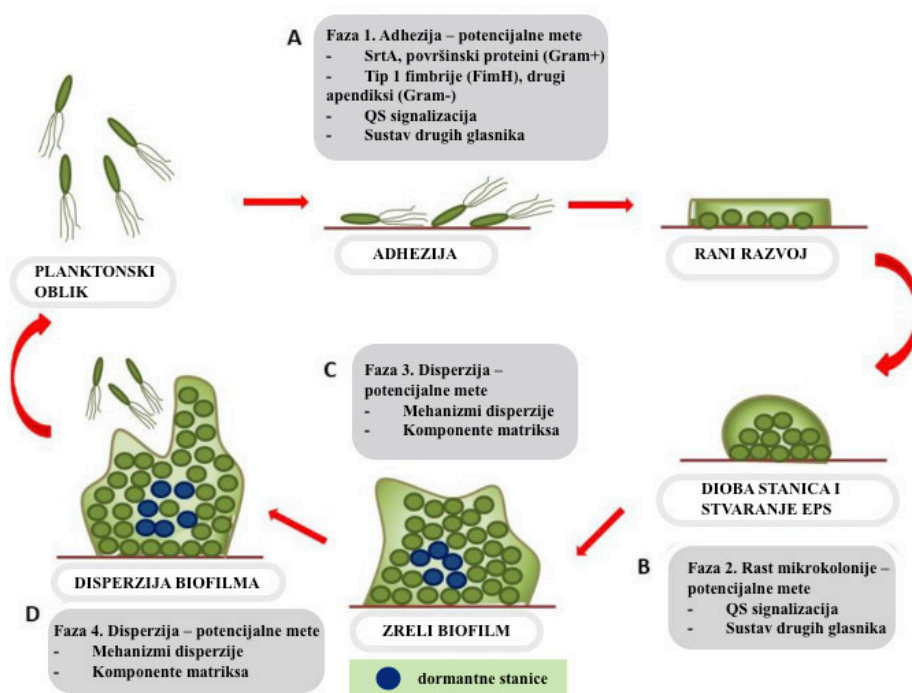
1.1. Biofilm

Biofilm predstavlja zajednicu različitih mikroorganizama u kojoj su stanice uklopljene u matriks kojeg same proizvode nakon adhezije na neku površinu. Spomenuti matriks sastavljen je od izvanstaničnih polimernih tvari (engl. *extracellular polymeric substances*, EPS), koju čine polisaharidi, proteini, lipidi, ekstracelularna DNA te, također, elementi domaćina – sluz i DNA. Biofilm se stvara na kateterima, stentovima, umjetnim zglobovima i drugim implantantima, igra važnu ulogu u akutnim infekcijama, kod Cronhove bolesti, a ujedno je i glavni faktor virulencije kod kroničnih infekcija uglavnom uzrokovanih bakterijama koje ubrajamo u ESKAPE grupu (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*). Biofilm je zajednica koja pojačava otpornost mikroorganizama na antibiotike i zato liječenje nije uspješno ukoliko se usmjeri isključivo na ubijanje patogena. Naime, biofilm koji nije iskorijenjen omogućuje ponovnu kolonizaciju bakterija (Chen i sur., 2013; Koo i sur., 2017; Parrino i sur., 2019).

Tablica 1. Medicinski značajne bakterije koje stvaraju biofilm i uzrokuju bolesti kod ljudi (modificirano prema Majik i Parvatkar, 2014).

Organizam	Klasifikacija	Bolest posredovana biofilmom
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram (-)	Plućne infekcije kod oboljelih od cistične fibroze
<i>Burkholderia cepacia</i>	Gram (-)	Plućne infekcije kod oboljelih od cistične fibroze
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram (-)	Opekline, infekcije uzrokovane traumom
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	Urinarne i gastrointestinalne infekcije
<i>Bordetella pertussis</i>	Gram (-)	Respiratorne infekcije
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram (+)	Opekline, infekcije pluća, infekcije uzrokovane kateterom
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram (+)	Sepsa, infekcije uzrokovane kateterom
<i>Streptococcus mutans</i>	Gram (+)	Karijes

1.1.1. Stvaranje biofilma



Slika 1. Faze razvoja biofilma (modificirano prema Parrino i sur., 2019).

Prvi korak u stvaranju biofilma (Slika 1.) je reverzibilna adhezija mikroorganizama na neku površinu pomoću adhezina (npr. pili, fimbrije, flagele, proteini vanjske membrane). Slijedi dioba stanica i izlučivanje EPS-a koji će stvoriti matriks za uklapanje stanica i koji će pojačati vezu između površine i bakterija čime adhezija postaje ireverzibilna. U konačnici dolazi do formiranja zrelog biofilma u kojem mikroorganizmi koegzistiraju i komuniciraju pomoću sustava za staničnu komunikaciju (*quorum sensing*, QS). U najdubljim slojevima nalaze se dormantne stanice, odnosno one stanice koje pokazuju manju metaboličku aktivnost. Smatra se da takve stanice nastaju aktivacijom TA sustava (engl. *toxin-antitoxin*), pri čemu se razgrađuje antitoksin prisutan u stanicama, a toksin djeluje bakteriostatski čime se inducira dormancija. Nakon što je stvoren zreli biofilm, neke se stanice mogu iz njega izdvojiti i kolonizirati novu površinu što se najčešće događa zbog nestanka nutrijenata (Parrino i sur., 2019; Renner i Weibel, 2011; Römling i Balsalobre, 2012).

1.1.2. Značajke biofilma

Mikroorganizmi se mogu vezati za gotovo bilo koji neživi materijal elektrostatskim ili hidrofobnim silama te za biološke površine interakcijom između adhezina i receptora domaćina. Vjerojatnost stvaranja biofilma povećava se ukoliko se radi o hrapavim površinama, hidrofilnim ili vlažnim podlogama, a faktori koji također imaju važnu ulogu su temperatura, pH i dostupnost nutrijenata. Matriks koji se potom stvara predstavlja trodimenzionalnu strukturu u kojoj postoji niz mikrokolonija između kojih prolaze vodeni kanali. Mikrokolonije čine različite bakterijske populacije koje međusobno surađuju razmjenjujući metabolite ili uklanjajući potencijalno toksične metabolite putem vodenih kanala. Primjećeno je da bakterijske stanice u biofilmu pokazuju različitu ekspresiju gena od onih koje žive izdvojeno za što je zaslužan proces horizontalnog transfera gena kojim se novi genetički materijal, nastao kao posljedica mutacije, prenosi u novu jedinku. Jedna od posebnosti biofilma je viskoelastičnost – istovremeno ispoljavanje elastičnih i viskoznih karakteristika, odnosno biofilm će se deformirati ukoliko je podvrgnut nekakvom mehaničkom stresu, no, s vremenom će ponovno poprimiti trodimenzionalnu strukturu gotovo istu kao i prije deformacije. Naposljetku, biofilm je zajednica pa kao takva ima načine komunikacije između bakterijskih stanica koji joj pomažu u njegovom stvaranju, izdvajanju pojedinih jedinki iz biofilma, regulaciji ponašanja i metaboličke aktivnosti (Kokare i sur., 2009; Koo i sur., 2017; Peterson i sur., 2015).

1.1.3. Uzroci rezistencije na antibiotike

Mikroorganizmi koji egzistiraju u biofilmu u odnosu na one koji su samostalni otporniji su na djelovanje antibiotika iz nekoliko razloga. U prvom redu, biofilm za antibiotike predstavlja fizičku barijeru koja im onemogućuje da uopće dođu do stanica. Zatim, u najdubljim slojevima biofilma postoje tzv. dormantne stanice koje pokazuju manju metaboličku aktivnost u odnosu na normalne stanice, što ih čini slabijom metom za konvencionalne antibiotike čiji su cilj upravo metabolički procesi (sinteza proteina, stanične membrane i stanične stijenke, replikacija DNA). Također, mikroorganizmi zadržavaju mehanizme za rezistenciju na antibiotike čak i u biofilmu, a kako je to zajednica njihove visoke koncentracije, onda će biti favoriziran horizontalni transfer gena, odnosno transfer gena za rezistenciju između jedinki (Koo i sur., 2017; Parrino i sur., 2019).

1.2. Inhibicija biofilma

1.2.1. Inhibicija adhezije

Gram pozitivne bakterije na vanjskoj strani svoje membrane imaju proteine koji se zajedničkim imenom nazivaju MSCRAMMs (engl. *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Ti proteini usidreni su u membranu, za što je odgovoran enzim sortaza A (SrtA), membranska transpeptidaza koja prepoznaje motiv LPXTG (leucin, prolin, x (bilo koja aminokiselina), treonin, glicin). Taj enzim uzrokuje cijepanje amidne veze između treonina i glicina, nakon čega se treoninski ostatak veže za peptidoglikan. Inhibicija ovog važnog enzima u patogenezi Gram pozitivnih bakterija onemogućit će nastanak biofilma. Ono što SrtA čini obećavajućom metom za nove antibiotike je činjenica da je to membranski enzim što podrazumijeva lakšu dostupnost potencijalnim lijekovima. Osim toga, taj enzim nije prisutan u eukariotskim stanicama, čime se smanjuje toksičnost potencijalnog lijeka (Mandlik i sur., 2008; Parrino i sur., 2019; Ton-That i sur., 2004).

Nadalje, Gram negativne bakterije na svojim membranama eksprimiraju tip 1 fimbrije te lektine LecA i LecB. Tip 1 fimbrije omogućavaju vezanje na stanice domaćina, ali i na nežive površine. Lektini se vežu na ugljikohidrate u tkivima domaćina: Lec A specifično prepoznaje D-galaktozu, a Lec B prepoznaje L-fukozide i D-manozide (Parrino i sur., 2019).

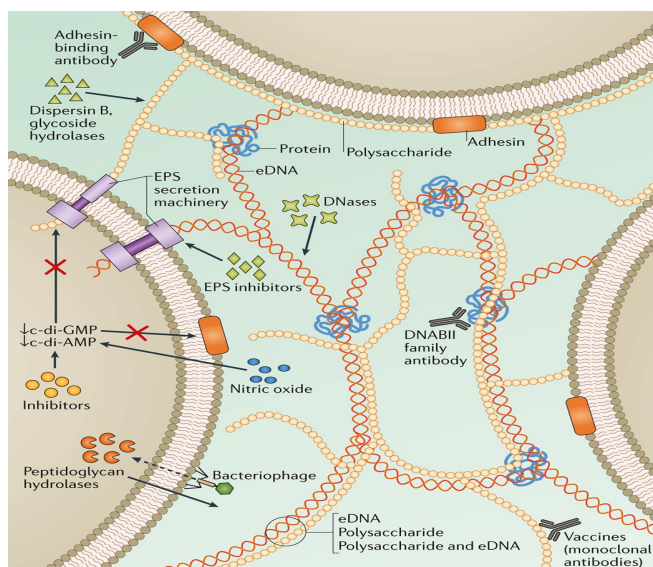
Postoji više mogućnosti za ciljanje adhezina, pri čemu bi došlo do inhibicije adhezije: male molekule tipa manozida koje će se vezati na adhezine i onemogućiti prijanjanje bakterija uz površinu, peptide koji inhibiraju samu sintezu adhezina ili razvoj protutijela koja će ciljati određene sastavnice EPS (Koo i sur., 2017; Roy i sur., 2018).

Većina bolničkih infekcija povezana je s razvojem biofilma na površini medicinskih uređaja (Veerachamy i sur., 2014). Njegovo stvaranje nastoji se smanjiti oblaganjem (engl. *coating*) biomaterijala bakteriostatskim ili baktericidnim tvarima poput srebrovih iona ili vezanjem antibiotika za njihovu površinu. Također, fizičko-kemijska svojstva biomaterijala važan su faktor prilikom stvaranja biofilma, stoga se njihova površina oblaže tvarima koje povećavaju hidrofobnost ili hrapavost površine ili tvarima koje modificiraju naboj površine biomaterijala (Chen i sur., 2013).

1.2.2. EPS

Sastav EPS matriksa varira od jedinke do jedinke i ovisan je o lokalnim okolišnim

čimbenicima. Glavni su mu zadaci adhezija na površinu, mehanička stabilnost te zaštita od vanjskih utjecaja, odnosno imunološkog sustava domaćina i antibiotika (Kokare i sur., 2009; Koo i sur., 2017). Moguća su dva pristupa kod terapije usmjerene na matriks – inhibicija sinteze i dispergiranje već postojećeg matriksa (Parrino i sur., 2019).



Slika 2. Potencijalne mete EPS-a (modificirano prema Koo i sur., 2017).

1.2.2.1. Inhibicija sinteze EPS-a

Pokazalo se da sustav drugih glasnika ima vrlo važnu ulogu u stvaranju biofilma; glavni medijator u njegovom stvaranju je ciklički dimerni gvanozin monofosfat (c-di-GMP), uglavnom kod Gram negativnih patogena, te ciklički dimerni adenozin monofosfat (c-di-AMP).

Signalna kaskada koja uključuje c-di-GMP kontrolira pomicanje flagele i pila, sintezu adhezina i egzopolisaharida, sintezu sekundarnih metabolita i disperziju biofilma. Primjerice, enzim glukoziltransferaza kod Gram pozitivnog patogena *S. aureus* reguliran je ovom signalnom kaskadom, a odgovoran je za produkciju glukana koji su sastavni dio EPS-a. Također, produkcija egzopolisaharida Psl i Pel kod Gram negativnog patogena *P. aeruginosa* kontrolirana je istom signalnom kaskadom. Sustav c-di-GMP-a reguliran je dvama enzimima: digvanilat ciklazom, koja je odgovorna za njegovu sintezu iz GTP-a, te fosfodiesterazom, koja je odgovorna za njegovu degradaciju. Navedeni enzimi održavaju razine c-di-GMP-a u bakterijskoj stanici, pri čemu pojačana ekspresija fosfodiesteraze uzrokuje smanjene razine c-di-GMP, a time i disperziju biofilma, dok pojačana ekspresija digvanilat ciklaze djeluje obrnuto

i uzrokuje stvaranje biofilma (Koo i sur., 2017; Parrino i sur., 2019; Römling i Balsalobre, 2012; Valentini i Filloux, 2016).

Ukoliko je meta potencijalnog lijeka c-di-GMP, nekoliko je mogućih strategija: modulacija sinteze ili degradacija c-di-GMP, interferiranje prilikom njegovog vezanja na receptore te smanjenje ekspresije djelovanjem na genetičkoj razini. U konačnici, c-di-GMP dobra je meta novih potencijalnih antibakterijskih lijekova, jer se enzimi koji reguliraju njegove razine ne nalaze u eukariotima, pa se tako može djelovati na njegovu sintezu, odnosno razgradnju s malim toksičnim učincima za domaćina (Parrino i sur., 2019).

C-di-AMP kontrolira bakterijski odgovor na stresne okolišne uvjete poput oksidativnog stresa i izloženosti antibioticima. Kod Gram pozitivnih patogena uključen je u signalnu kaskadu koja regulira ekspresiju glukoziltransferaze, enzima odgovornog za stvaranje glukana koji čine osnovnu komponentu EPS-a. Razine c-di-AMP-a kontroliraju enzimi diadenilat ciklaza, koja ga stvara, te fosfodiesteraza, koja ga razgrađuje. Ukoliko su razine sekundarnog glasnika povišene, doći će do stvaranja biofilma (Peng i sur., 2016; Römling i Balsalobre, 2012).

Gvanozin tetrafosfat (ppGpp) i gvanozin pentafosfat (pppGpp) molekule su koje sudjeluju u regulaciji ekspresije gena ukoliko je bakterija izložena stresnim uvjetima poput manjka nutrijenata. Pokazalo se da su navedene molekule uključene u stvaranje biofilma kod nekoliko Gram pozitivnih vrsta, a također i da molekule promoviraju nastanak dormantnih stanica u dubljim slojevima biofilma. Moguće je interferirati s ovim procesima djelujući na sintezu, degradaciju ili inaktivirajući ppGpp, odnosno pppGpp (Parrino i sur., 2019; Römling i Balsalobre, 2012).

1.2.2.2. Dispergiranje matriksa

U prvom redu, na već formirani biofilm može se djelovati enzimima koji ciljaju pojedinačne komponente matriksa i razlažu ih: alginat liaza, glukano hidrolaze (dekstranaza, mutanaza), glikozid hidrolaze, DNaze, peptidoglikan hidrolaze i disperzin B. Osim direktnog pristupa, moguće je inducirati događaje koji će prirodno dovesti do disperzije biofilma poput održavanja niskih koncentracija c-di-GMP djelovanjem na enzime koji sudjeluju u regulaciji njegovih razina. Skupina proteina poznatih kao DNABII važna je za održavanje strukture eDNA pa postoji potencijal za razvoj protutijela koja bi se vezala za DNABII proteine i onemogućila stvaranje adekvatne strukture eDNA čime bi se izazvala disperzija biofilma (Koo

i sur., 2017; Parrino i sur., 2019).

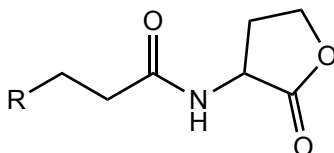
1.2.3. Stanična komunikacija (engl. *quorum sensing*, QS)

Bakterije su se dugo vremena smatrale autonomnim organizmima, no ispostavilo se da su ipak sposobne surađivati i tako si međusobno povećati šansu preživljavanja. Naime, bakterijske stanice u vlastiti okoliš otpuštaju male molekule poznate pod nazivom autoinduktori koji svoje ime duguju činjenici da stimuliraju i vlastitu sintezu. Oni se akumuliraju u okolišu i njihova se koncentracija povećava kako raste bakterijska populacija. Postizanjem koncentracije praga (engl. *threshold concentration*), koja ovisi o gustoći stanica, dolazi do promjene bakterijskog ponašanja, odnosno dolazi do ekspresije gena koji se povezuju s procesima za koje je potreban velik broj stanica poput stvaranja biofilma, bioluminiscencije, produkcije antibiotika, sekrecije faktora virulencije i slično. Dakle QS igra važnu ulogu kod patogenih bakterija olakšavajući im invaziju i razaranje organizma domaćina (Geske i sur., 2007; Parrino i sur., 2019; Williams i sur., 2007).

Da bi QS sustav uopće funkcionirao, bakterijska stanica mora biti u mogućnosti sintetizirati signalne molekule, prepoznati signale te aktivirati ili inaktivirati ciljne gene ovisno o primljenoj informaciji (Majik i Parvatkar, 2014). Nadalje, da bi se molekula smatrala dijelom QS sustava, potrebno je zadovoljiti sljedeće kriterije : a) molekula se sintetizira prilikom određene faze rasta, pod određenim fiziološkim uvjetima ili kao odgovor na okolišne čimbenike, b) molekula se nakuplja u izvanstaničnom prostoru i interakcijom s njima aktivira receptore, c) koncentracija molekule raste do određenog praga i onda se aktiviraju specifični učinci, d) odgovor stanice ne smije biti samo metabolizam molekule ili odgovor na njezinu toksičnost. Pritom treba naglasiti važnost posljednjeg kriterija, jer postoje bakterijski metaboliti koji zadovoljavaju prva tri kriterija. Primjerice, toksični bakterijski metaboliti također se nakupljaju u izvanstaničnom prostoru do granične koncentracije kada uzrokuju odgovarajuće učinke (Williams i sur., 2007).

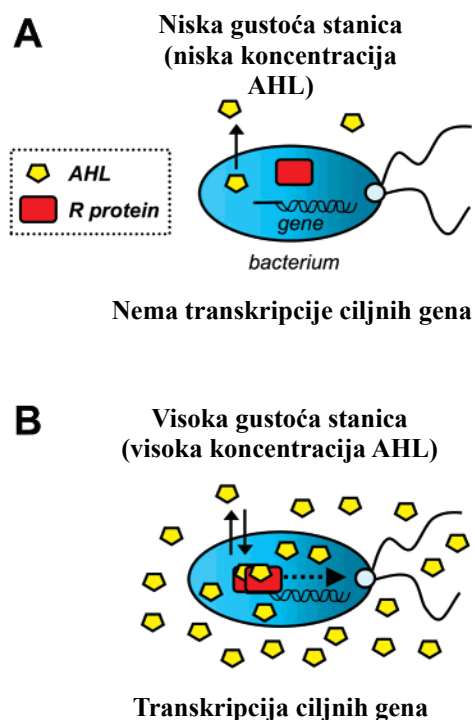
Signalne molekule QS sustava mogu biti ketoni, masne kiseline, adrenalin, noradrenalin, kinoloni i slično. Međutim, tri najvažnija sustava su *N*-acil homoserin laktonski sustav (AHL), tipičan za Gram negativne bakterije, sustav autoinducirajućih peptida (AIP), tipičan za Gram pozitivne bakterije, te sustav autoinduktora-2 (AI-2), koji se može naći i u Gram pozitivnim i u Gram negativnim bakterijama (Brackman i Coenye, 2014; Parrino i sur., 2019; Rémy i sur., 2018).

AHL molekule u svojoj strukturi imaju homoserinski laktonski prsten (HSL) koji je nesupstituiran u β - i γ - položaju, dok je amino skupina u α -položaju *N*-acilirana, pri čemu broj ugljikovih atoma može varirati od 4 do 18 (Slika 3.). Usto, može varirati i stupanj zasićenosti acilnog lanca. Pokazano je da se osjetljivost HSL prstena na hidrolizu smanjuje produljenjem acilnog lanca. AHL s otvorenim HSL prstenom nisu aktivne QS signalne molekule (Williams i sur., 2007).



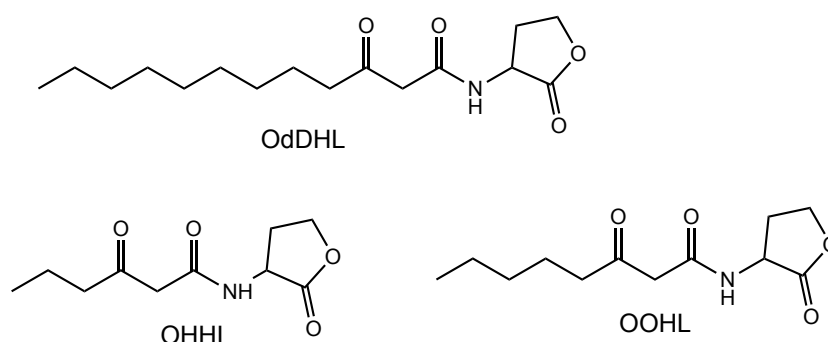
Slika 3. Kemijska struktura AHL (modificirano prema Williams i sur., 2007).

AHL proizvodi porodica proteina LuxI (AHL sintaza) koristeći acil-acil proteinski nosač (engl. *acyl-acyl carrier protein*, acyl-ACP) kao izvor acilnog lanca te *S*-adenozil metionin (SAM) kao izvor HSL. Nakon postizanja određene koncentracije AHL-a u izvanstaničnom prostoru, AHL stupa u interakciju s transkripcijskim faktorom LuxR te nastali kompleks uzrokuje aktivaciju ili represiju ciljnih gena, a osim toga, pojačava se i ekspresija gena *luxI*, odnosno AHL inducira vlastitu proizvodnju (Slika 4.).



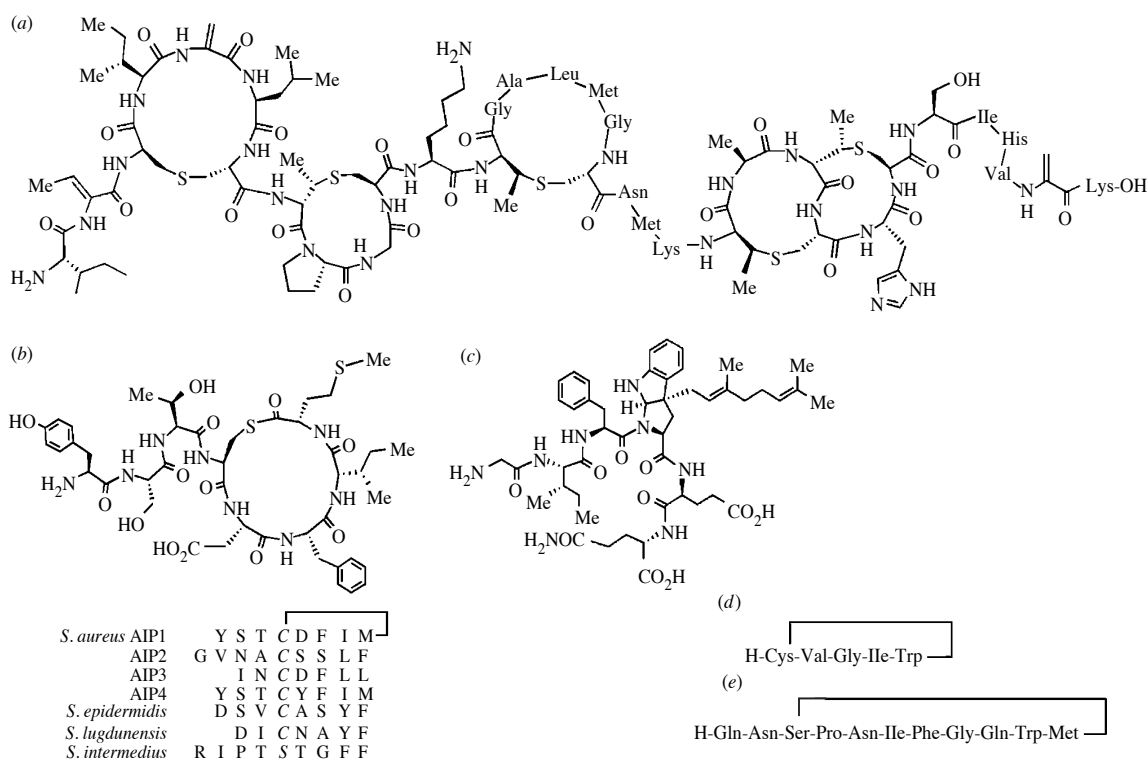
Slika 4. Prikaz QS kod Gram negativnih bakterija (modificirano prema Geske i sur., 2007).

Postoje različite vrste AHL-a, a bakterije mogu čak i istovremeno proizvoditi više različitih AHL-a. Kod *Agrobacterium tumefaciens*, biljnog patogena, prisutan je QS sustav u kojem se proizvodi *N*-(3-oksooktanoil)-L-homoserin lakton (OOHL, Slika 5.), koji se veže na receptor TraR. Nadalje, *Pseudomonas aeruginosa*, značajan oportunistički patogen kod ljudi, proizvodi *N*-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton (OdDHL, Slika 5.) i *N*-butanoil-L-homoserin lakton (BHL), koji se vežu na LasR, odnosno na RhlR. *Vibrio fischeri*, za razliku od prethodna dva primjera, koristi QS za bioluminiscenciju, pri čemu dolazi do vezanja *N*-(3-oksoheksanoil)-L-homoserin laktone (OHHL, Slika 5.) na receptor LuxR (Geske i sur., 2007; Williams i sur., 2007).



Slika 5. Primjeri različitih AHL signalnih molekula (modificirano prema Geske i sur., 2007).

Sljedeći bitan QS sustav koristi AIP kao signalne molekule. Ti peptidi podliježu posttranslacijskim modifikacijama i duljina im varira od 5 do 34 aminokiselina.



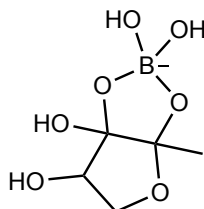
Slika 6. Kemijske strukture QS signalnih molekula : a) nizin iz *Lactococcus lactis*; b) AIP iz *Staphylococcus aureus* i drugih *Staphylococcus* vrsta; c) ComX iz *Bacillus subtilis* RO-E-2; d) AIP iz *Lactobacillus plantarum*; e) AIP iz *Enterococcus faecalis* (modificirano prema Williams i sur., 2007).

AIP se mogu svrstati u tri porodice: oligopeptidni antibiotici, tiolaktonski peptidi te izoprenilirani triptofanski peptidi. ComX iz *B. subtilis* i nizin iz *L. lactis* (Slika 6.) predstavnici su oligopeptidnih antibiotika, za koje su karakteristični makrociklički prstenovi koji sadrže lantioninsku skupinu. Šesnaesteročlani makrociklički peptid s kratkim linearnim peptidom na *N*-terminalnom dijelu značajka je tiolaktonskih peptida poput AIP-1 (Slika 6.) koji je dio QS sustava kod *S. aureus*.

S. aureus, kao predstavnik Gram pozitivnih bakterija, koristi AIP koji će se, nakon što dosegnu određenu koncentraciju, vezati na AgrC, senzornu histidin kinazu koja dalje fosforilira AgrA čime se potiče transkripcija gena za RNAIII. Ona je glavni efektor ovog QS sustava i promovirat će transkripciju gena za virulenciju poput serinskih proteaza, α -hemolizina i drugih (Brackman i Coenye, 2014; Pang i sur., 2010; Williams i sur., 2007).

Konačno, QS sustav koji povezuje i Gram pozitivne i Gram negativne bakterije koristi furanozil borat diester, odnosno AI-2 (Slika 7.). LuxS je protein odgovoran za sintezu AI-2,

koja kreće iz *S*-ribozil-L-homocisteina (SRH), pucanjem veze između tiolne skupine i riboze, čime se dobiva homocistein i daljnjom pregradnjom 4,5-dihidroksi-2,3-pentadion (DPD), prekursor AI-2. DPD dalje prolazi kroz različite modifikacije, pri čemu nastaje AI-2.

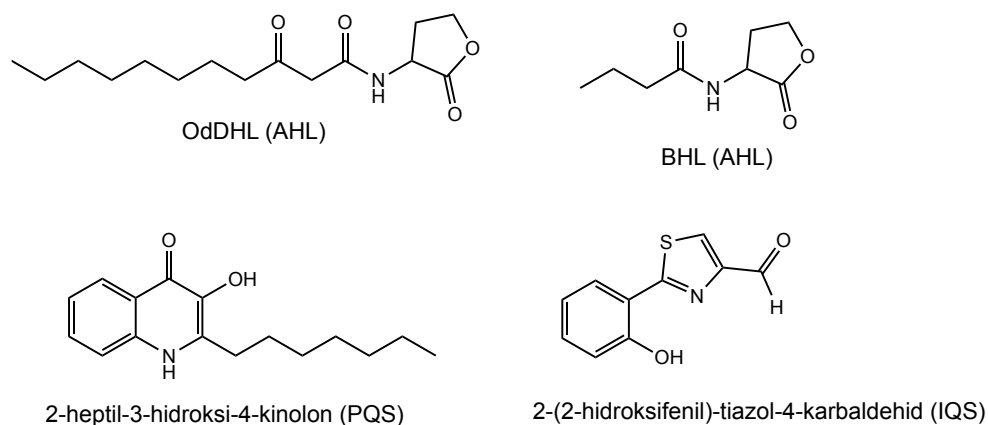


Slika 7. Kemijska struktura AI-2 (modificirano prema Williams i sur., 2007).

AI-2 QS najbolje je opisan kod bakterija roda *Vibrio* gdje je odgovoran za bioluminiscenciju. Naime, nakon postizanja koncentracije praga, AI-2 se veže na LuxP receptor čineći s njim kompleks koji stupa u interakciju s LuxQ, membranskom histidin kinazom čime dolazi do promjene ekspresije gena (Brackman i Coenye, 2014; Williams i sur., 2007).

1.2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa oportunistički je patogen koji uzrokuje bolničke infekcije kod osoba s cističnom fibrozom i drugim plućnim bolestima, kod opekлина, kod starijih i imunokompromitiranih osoba. Veliki problem kod liječenja tih infekcija predstavlja velika otpornost te bakterije na antibiotike. QS sustavi kod *P. aeruginosa* posebno su dobro istraženi, te su uočena čak četiri istovremeno prisutna QS, redom *las*, *rhl*, *pqs* te *iqs* sustavi (Lee i Zhang, 2015). *P. aeruginosa* koristi QS za stvaranje biofilma i ekspresiju faktora virulencije poput elastaza koje smanjuju flaksibilnost stanične membrane, piocijanina i cijanida koji interferiraju s procesom staničnog disanja ili egzotoksina A koji je povezan sa staničnom smrću (Reuter i sur., 2016).



Slika 8. Kemijske strukture QS signalnih molekula kod *P. aeruginosa* (modificirano prema Lee i Zhang, 2015).

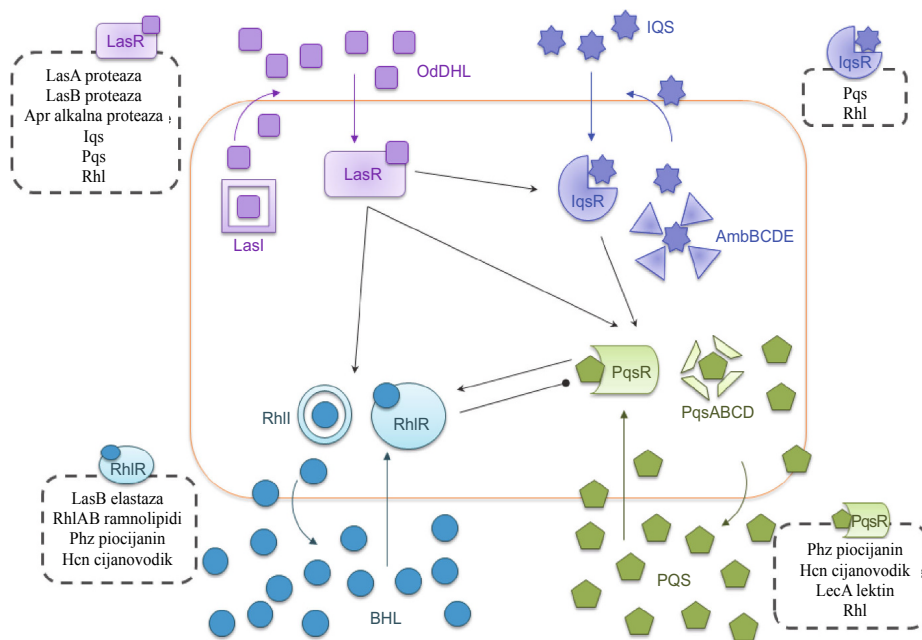
Autoinduktori u *las* i *rhl* sustavima su AHL molekule, OdDHL i BHL, koje nastaju uz enzime LasI i RhII sintaze (Slika 8.). Te molekule nakon postizanja koncentracije praga stupaju u interakciju sa svojim receptorima LasR, odnosno RhIR te nastaje kompleks koji djeluje na ekspresiju ili represiju gena. Poznat je niz proteina koji su zaslužni za regulaciju *las* i *rhl* sustava, primjerice RsaL, QscR, QslA te VqsR. Od navedenih, jedino se VqsR povezuje s pozitivnom regulacijom i to kroz povećanu ekspresiju AHL signalnih molekula te faktora virulencije. Negativna regulacija preostalim proteinima postiže se represijom gena *lasI* (RsaL) te onemogućavanjem vezanja na DNA formiranjem heterodimera s kompleksima LasR-OdDHL i RhIR-BHL (QscR) ili vezanjem na LasR (QslA).

Nadalje, PQS (engl. *Pseudomonas quinolone signal*) je sustav u kojemu je signalna molekula 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon, čiju sintezu regulira PqsR koji se veže na promotorsku regiju skupine gena *pqsABCDE* (Slika 8.). PqsA, PqsB, PqsC i PqsD odgovorni su za pojedine dijelove sinteze PQS-a, pri čemu nastaje njegov prekursor, 2-heptil-4-kinolon (HHQ). Uloga PqsE još uvijek je uglavnom nepoznata. Sintezu PQS-a završava PqsH koji hidroksilira HHQ. Ekspresija faktora virulencije također je pod domenom PqsR, a samu ekspresiju PqsR inducira LasR (Lee i Zhang, 2015; Williams i sur., 2007).

Posljednji jest integrirani QS sustav (IQS) čija je signalna molekula 2-(2-hidroksifenil)-tiazol-4-karbaldehid (Slika 8.). Skupina gena *ambBCDE* uključena je u sintezu navedene signalne molekule koja se zatim veže na receptor IqsR i, kao i dosad, dovodi do ekspresije faktora virulencije (Lee i Zhang, 2015).

Sva četiri QS sustava hijerarhijski su organizirana pri čemu je *las* sustav na vrhu ljestvice (Slika 9.). Naime, kompleks LasR-OdDHL inducira ekspresiju *rhlR*, *rhlI*, *lasI*, *pqsR* i

pqsH, iz čega je vidljivo da je nužan za produkciju BHL-a, OdDHL-a te PQS-a, a također se pokazalo da sudjeluje i u produkciji IQS signalnih molekula. Međutim, u slučaju defekta *las* sustava, njegovu ulogu može djelomično preuzeti IQS sustav indukcijom ekspresije *pqsR* i indirektno *rhlI*, a primjećeno je i da je RhlR sposoban inducirati ekspresiju *lasI*. Nadalje, kompleks RhlR-BHL uglavnom inducira ekspresiju *rhlI*, no odgovoran je i za inhibiciju ekspresije *pqsR*. Sam PqsR inducira ekspresiju *rhlI* (Lee i Zhang, 2015; Reuter i sur., 2016).



Slika 9. Shematski prikaz QS signalne mreže i pripadajućih gena koje pojedini sustav eksprimira kod *P. aeruginosa* (modificirano prema Lee i Zhang, 2015).

1.2.3.2. Inhibitori QS

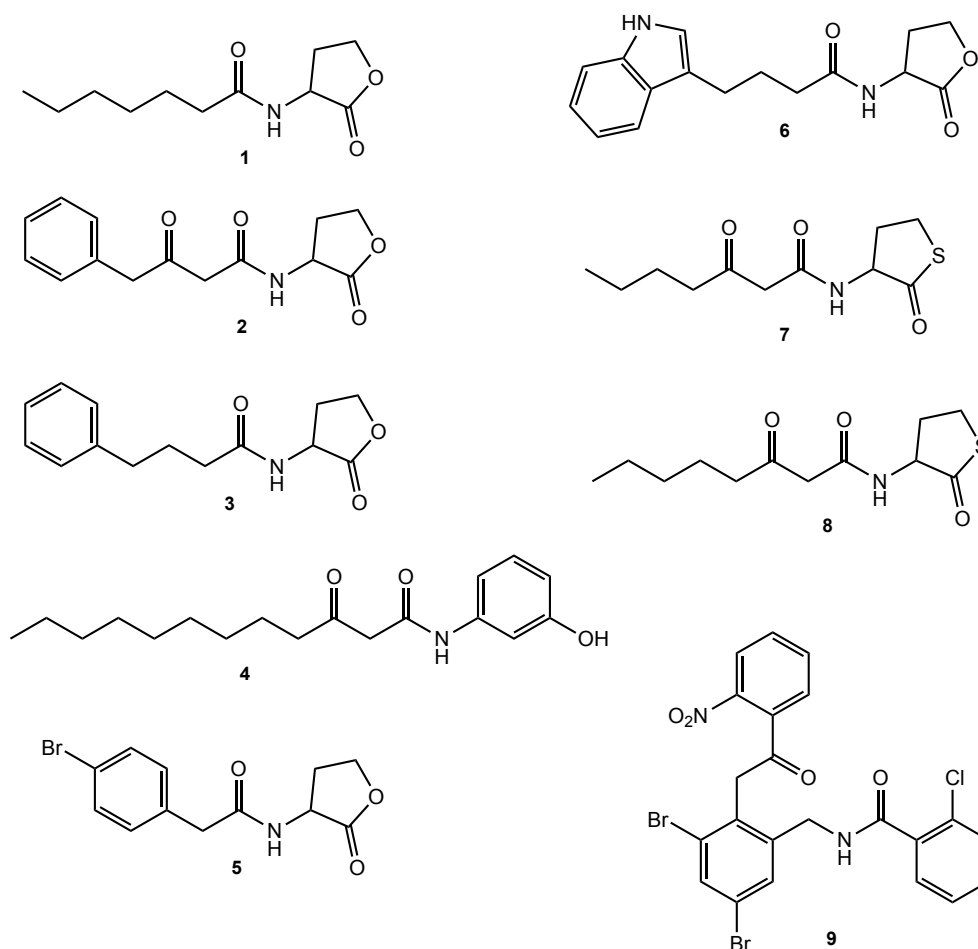
Zbog sve veće rezistencije na konvencionalne antibiotike, inhibitori QS postaju atraktivna nova meta u borbi protiv bakterijskih infekcija. Metode kojima se potencijalno može interferirati s QS sustavom podrazumijevaju direktnu degradaciju QS signalnih molekula, inhibiciju njihove sinteze, antagonistički učinak na njihove receptore, supresiju QS i kompleksiranje signalnih molekula (Hirakawa i Tomita, 2013).

Enzimska degradacija signalnih molekula (engl. *quorum quenching*, QQ) podrazumijeva razgradnju signalnih molekula kako bi se spriječilo postizanje koncentracije praga, čime bi se aktivirao QS. Enzimi razgrađuju AHL signalne molekule i možemo ih

razvrstati u četiri skupine s obzirom na mehanizam djelovanja: laktonaze, acilaze, oksidaze i reduktaze. Laktonaze hidroliziraju HSL prsten, acilaze hidroliziraju amidnu vezu između HSL-a i acilnog lanca, a oksidaze i reduktaze kataliziraju redoks reakcije kojima se modificira struktura AHL-a (Tang i Zhang, 2014).

Inhibicija nastajanja signalnih molekula AHL sustava moguća je primjenom spojeva čija je struktura slična SAM-u, početnoj molekuli koja služi kao izvor homoserinskog laktonskog prstena AHL-a. Takvi analozi vezat će se na LuxI receptor čime je inhibirana sinteza AHL signalnih molekula. To su primjerice *S*-adenozil-homocistein, sinefungin i 5-metiltioadenozin. Isto je moguće postići primjenom cikloleucina, koji je inhibitor sinteze SAM-a. Također, uočeno je da antibiotik azitromicin pokazuje djelovanje na biofilm kod *P. aeruginosa* zahvaljujući interferenciji sa sintezom signalnih molekula OdDHL i BHL. Sinteza AI-2 odvija se uz pomoć dva enzima, 5-metiltioadenozin nukleozidaze (MTAN) i LuxS. Poznata su dva inhibitora LuxS: *S*-anhidroribozil-L-homocistein te *S*-homoribozil-L-cistein, temeljem kojih su sintetizirani i drugi potencijalni inhibitori. Inhibitori MTAN su imucilin i njegovi analozi. MTAN je obećavajuća meta jer je taj enzim odgovoran za nastajanje SRH-a, a ujedno čini i važan korak u biosintezi SAM-a što upućuje da bi se istovremeno moglo inhibirati dva tipa QS sustava. Molekule koje bi inhibirale AIP sustav su također potencijalni lijekovi, međutim do danas nisu razvijeni (Brackman i Coenye, 2014; Tang i Zhang, 2014).

Kao antagonisti receptora za AHL identificirani su prirodni spojevi poput bergamotina i dihidroksibergamotina iz grejpa, alicina i ajoena iz češnjaka te polifenoli baikalin i epigalokatehin, a isto su tako sintetizirani analozi AHL molekula te su identificirani furanoni i analozi, bizmut-porfirin kompleksi, teški metali, nanomaterijali i slično (Brackman i Coenye, 2014; Zhang i Li, 2016). Značajni primjeri antagonista AHL receptora su (Slika 10): *N*-heptanoil-L-homoserin lakton (aktivan naspram TraR; **1**), *N*-(3-oksofenilbutanoil)-L-homoserin lakton (**2**) i *N*-(fenilbutanoil)-L-homoserin lakton (aktivni naspram LuxR; **3**), 2-aminofenolni analog OdDHL (aktivan naspram LasR; **4**), *N*-(4-bromofenilacetanoil)-L-homoserin lakton (**5**) te AHL indol (**6**). Nasuprot tome, otkriveni su i superaktivatori QS za koje se smatra da mogu inducirati QS signalizaciju i pri manjoj gustoći stanica od praga pri čemu bi se aktivirao imunski sustav domaćina. Identificirani su sljedeći spojevi (Slika 10): *N*-(3-oksoheptanoil)-D,L-homoserin tiolakton (**7**), *N*-(3-oksooktanoil)-D,L-homoserin tiolakton (**8**) i trifenilni superaktivator (**9**) (Geske i sur., 2007; Zhang i Li, 2016).



Slika 10. Kemijske strukture inhibitora (1-6) i superaktivatora AHL receptora (7-9)
(modificirano prema Geske i sur., 2007)

LuxP, receptor za AI-2, moguće je aktivirati derivatima DPD (npr. alkilni, karbonatni derivati) i molekulama slične strukture, a inhibicija je moguća furanonima kao i kod AHL receptora, tiazolidindionima te kompleksima koji sadrže negativno nabijeni atom bora. Derivati samih AIP su mogući inhibitori AIP receptora, a također treba spomenuti i da AIP jedne grupe mogu inhibirati receptore druge grupe (kod *S. aureus* AIP-1 može biti inhibiran pomoću AIP-4). Kod ove vrste QS najistraživanije područje je identifikacija inhibitora RNAlII (engl. *RNAlII inhibiting peptide*, RIP) te je otkriveno da, osim analoga RIP, kao inhibitor djeluje i nepeptidni spoj hamamelitanin (Brackman i Coenye, 2014; Zhang i Li, 2016).

Kompleksiranje signalnih molekula još uvijek je nedovoljno istraženo područje, no poznato je da se za inhibiciju QS-a mogu upotrijebiti ciklodekstrini, molekule koje stvaraju stabilne komplekse s mnogim organskim spojevima. Ova metoda omogućila bi održavanje

koncentracije signalnih molekula ispod koncentracije praga čime ne bi došlo do stvaranja biofilma.

Precizna regulacija QS sustava vrlo je važna te se u bakterijama mogu naći i supresori koji osiguravaju da transkripcija ciljnih gena ne započne prije nego se dosegne koncentracija praga. Aktivacija supresora predstavlja još jedan način na koji bi se potencijalno mogao inhibirati biofilm. Na primjer, kod bakterije *A. tumefaciens* postoji protein TrlA koji se veže na TraR i onemogućuje mu vezanje na DNA čime ne dolazi do transkripcije ciljnih gena. Nadalje, *P. aeruginosa* posjeduje proteine QslA, koji se veže na LasR, i QscR, koji se veže na LasR i RhIR, pri čemu oba onemogućavaju transkripciju gena. Dodatno, *P. aeruginosa* posjeduje i RsaL koji se direktno veže na DNA, na promotorsku regiju ispred *lasI* gena (Tang i Zhang, 2014).

1.2.4. Metabolička interferencija

Uočeno je da i metaboliti imaju utjecaj na stvaranje biofilma, primarno egzogene aminokiseline i željezo. L-arginin i L-metionin su pokazali obećavajuće rezultate kao moguća pomoćna terapija uz antibiotike. L-arginin je bazična aminokiselina, koja kao takva uzrokuje promjene u pH, čime se mijenja arhitektura biofilma, a također uzrokuje represiju gena zaslužnih za sintezu EPS-a. L-metionin uzrokuje degradaciju eDNA regulacijom gena koji kodiraju za DNAze (Koo i sur., 2017).

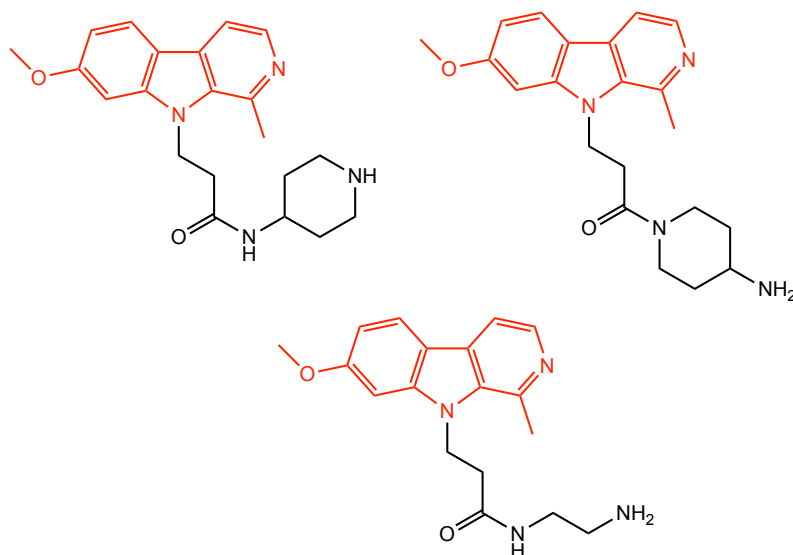
Dokazano je da je željezo važno prilikom stvaranja biofilma i da kod visokih razina željeza postoji i veća količina stvorenog biofilma. Studije su, stoga, strategiju usmjerile na keliranje željeza pomoću laktoferina ili primjenom galija, elementa koji je kemijski sličan željezu. U oba slučaja stvaranje biofilma bilo je onemogućeno. Oksidacijsko stanje željeza također je bitan čimbenik jer oblik koji bakterijama odgovara jest fero-ion (Koo i sur., 2017; Yang i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Biofilm predstavlja velik problem prilikom liječenja bakterijskih infekcija zbog razvoja multirezistentnih sojeva (engl. *multi-drug resistant*, MDR). Naime, trodimenzionalna struktura biofilma stvara mikrookoliš u kojem su bakterije izložene različitim stresnim uvjetima (nedostatak nutrijenata, izloženost antibioticima, različiti uvjeti pH i slično) na koje se u konačnici i prilagođavaju (Kaur i sur., 2017; Koo i sur., 2017). Stoga je potrebno usmjeriti istraživanja prema razvoju novih spojeva, potencijalnih inhibitora biofilma.

U ranijim istraživanjima u Zavodu za farmaceutsku kemiju sintetizirani su derivati klorokina i primakina sa supstituentima koji su sadržavali primarne amino skupine, jer se pokazalo da takvi spojevi imaju najviše potencijala za prolazak stanične membrane Gram (-) patogena i akumulaciju u citoplazmi (Beus i sur., 2020). Isto tako, pripravljeni su derivati s acikličkim diaminom, koji je pokazao obećavajuće rezultate u inhibiciji nastanka biofilma kod Gram (+) *S. aureus* (Kaur i sur., 2017). Pripravljeni spojevi pokazali su značajno inhibitorno djelovanje na biofilm.

Po uzoru na te spojeve, cilj ovog rada bila je sinteza analognih derivata harmina (Slika 11.), alkaloida β -karbolinskog tipa, koji pokazuje niz farmakoloških učinaka, uključujući i antimikrobno djelovanje (Nenaah, 2010). U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovoga rada, bit će ispitano njihovo inhibitorno djelovanje na bakterijski biofilm.



Slika 11. Kemijske strukture sintetiziranih potencijalnih inhibitora biofilma (harmin je označen crvenom bojom).

3. MATERIJALI I METODE

Tijek kemijskih reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F254 (Merck, Njemačka) te diklormetan/methanol (8:1) i cikloheksan/etil-acetat/methanol (1:1:0.5) kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni korišten je silikagel veličine čestica 0,063-0,200 mm (Sigma-Aldrich, SAD) uz iste pokretne faze kao u tankoslojnoj kromatografiji. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ($\lambda = 254$ i 366 nm).

Tališta (t_R) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama i nisu korigirana.

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-400 (Bruker, SAD) kod 400 i 600 MHz za ^1H i kod 101 i 151 MHz za ^{13}C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO- d_6 otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard u ^1H , odnosno signal dimetilsulfoksida (DMSO) u ^{13}C spektru. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom modu. IR spektri snimljeni su na Spectrum 2 FT-IR spektrofotometru (PerkinElmer, SAD).

Litijev hidroksid i klorovodična kiselina nabavljeni su od tvrtke Honeywell Fluka (Švicarska), trifluoroctena kiselina (TFA) i diklormetan od tvrtke Acros Organics (Belgija), natrijev hidroksid i natrijev klorid od tvrtke Kemika (Hrvatska). Harmin, 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU) te amini 4-amino-1-Boc-piperidin, 4-(*N*-Boc-amino)piperidin i *N*-Boc-etilendiamin nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD), *N,N*-diizopropiletilamin (DIEA) nabavljen je od tvrtke Alfa Aesar (SAD), metilakrilat i HATU od tvrtke TCI (Japan), acetonitrile (ACN) i etil-acetat od tvrtke Honeywell Riedel de Haën (Njemačka). Cikloheksan je nabavljen od tvrtke Carlo Erba Reagents (Francuska), petroleter od tvrtke PanReac AppliChem (Španjolska), a dietil-eter od tvrtke Macron Fine Chemicals (SAD). Sve kemikalije bile su *p.a.* stupnja čistoće.

3.1. Sinteza metil 3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propanoata (1)

Suspenzija harmina (0,250 g, 1,178 mmol) i DBU (0,334 ml, 2,238 mmol) u ACN-u (4 ml) miješana je 10 minuta na sobnoj temperaturi, te je potom dodan metil-akrilat (0,267 ml, 2,945 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24 h na 60 °C, zaštićena od svjetlosti. ACN je

uparen pod sniženim tlakom, a dobiveni produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (8:1). Dobiveni bijeli talog rastrljan je u smjesi dietil-etera i petroletera i odsisan.

Iskorištenje reakcije: 0,218 g (62,11%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,08 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,2$), 7,23 (d, 1H, 12, $J = 2,1$), 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$), 4,87–4,84 (m, 2H, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 3,55 (s, 3H, 4'), 2,95 (s, 3H, 13), 2,86–2,82 (m, 2H, 2').

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) 171,19 (3'), 160,61 (1), 142,41 (8), 140,64 (9), 137,90 (7), 134,40 (11), 128,63 (4), 122,39 (3), 114,31 (5), 112,25 (6), 109,49 (2), 93,66 (12), 55,61 (14), 51,49 (4'), 40,01 (1'), 34,09 (2'), 22,98 (13).

3.2. Sinteza 3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propanske kiseline (2)

Suspenziji estera (**1**) (0,198 g, 0,664 mmol) u metanolu (4 ml) dokapana je vodena otopina litijevog hidroksida (0,084 g, 2,013 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 2 h, nakon čega je metanol uparen pod sniženim tlakom. Dobivena suspenzija otopljen je u vodi i pH je namješten na 5,31 pomoću 5%-tne otopine NaOH i 10%-tne otopine HCl, pri čemu dolazi do taloženja kiseline **2**. Dobiveni bijeli talog rastrljan je dietil-eterom i odsisan.

Iskorištenje reakcije: 0,167 g (88,36%).

$t_f = 229,1\text{--}231,1\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,08 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,1$), 7,25 (d, 1H, 12, $J = 1,9$), 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,0$), 4,84–4,81 (m, 2H, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 2,96 (s, 3H, 13), 2,76–2,74 (m, 2H, 2').¹

¹ U spektru se ne vidi 4' -OH

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) 172,33 (3'), 160,59 (1), 142,45 (8), 140,63 (9), 137,80 (7), 134,41 (11), 128,60 (4), 122,36 (3), 114,27 (5), 112,25 (6), 109,47 (2), 93,68 (12), 55,57 (14), 40,18 (1'), 34,63 (2'), 22,96 (13).

3.3. Sinteza amida (3-5)

Opća metoda:

Suspenziji kiseline (**2**) (0,200 g, 0,703 mmol) u diklormetanu (5 ml) dodani su DIEA (0,268 ml, 1,547 mmol) i HATU (0,267 g, 0,703 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 20 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodan odgovarajući amin, te je nastavljeno miješanje na sobnoj temperaturi 1-5 sati. Diklormetan je uparen pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja otopljen je u etil-acetatu (50 ml). Dobivena otopina ekstrahirana je s 3x50 ml zasićene otopine NaCl. Organski sloj filtriran je kroz Phase separator, nakon čega je etil-acetat uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) te je rastrljan u smjesi dietil-etera i petroletera i odsisan.

3.3.1. *Tert*-butil 4-(3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propanamido)piperidin-1-karboksilat (**3**)

Amin: 4-amino-1-Boc-piperidin (0,128 g, 0,639 mmol).

Trajanje reakcije: 1 h.

Iskorištenje reakcije: 0,168 g (56,38%).

ESI-MS (m/z) 467,2 ($M+1$)⁺.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,1$), 7,80 (d, 1H, 4', $J = 7,6$), 7,19 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$), 4,79 (t, 2H, 1', $J = 7,0$), 3,90 (s, 3H, 14), 3,70–3,60 (m, 3H, 5', 7', 9'), 2,97 (s, 3H, 13), 2,76 (t, 2H, 7', 9', $J = 29,9$), 2,57 (t, 2H, 2', $J = 6,9$), 1,52–1,46 (m, 2H, 6', 10'), 1,37 (s, 9H, 13', 14', 15'), 1,04 – 0,96 (m, 2H, 6', 10').

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) 169,02 (3'), 160,41 (11'), 153,86 (1), 142,58 (8), 140,77 (9), 137,79 (7), 134,55 (11), 128,60 (4), 122,29 (3), 114,34 (5), 112,24 (6), 109,09 (2), 94,10 (12), 78,61 (12'), 55,53 (14), 45,45 (5'), 40,92 (1'), 36,47 (6', 7', 9', 10'), 31,04 (2'), 28,05 (13', 14', 15'), 23,08 (13).

3.3.2. *Tert*-butil (1-(3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propanoil)piperidin-4-il)karbamat (4)

Amin: 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (0,128 g, 0,639 mmol).

Trajanje reakcije: 5 h.

Iskorišćenje reakcije: 0,093 g (62,42%).

$t_i = 211,0\text{--}212,7\text{ }^\circ\text{C}$.

ESI-MS (m/z) 467,2 ($M+1$) $^+$.

IR (ATR) ν_{max} 3426,39, 3276,03, 3106,11, 2944,74, 1701,84, 1679,56, 1616,08, 1532,96, 1564,26, 1367,15, 1345,31, 1247,54, 1238,05, 1170,47, 1141,93, 1028,40, 839,56, 815,54, 715,77, 557,20 cm^{-1} .

^1H NMR (600 MHz DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 8,36 (s, 1H, 7), 8,31 (d, 1H, 3, $J = 8,8$), 7,38 (s, 1H, 6), 7,03 (d, 1H, 10', $J = 8,7$), 6,83 (d, 1H, 2, 12, $J = 7,5$), 4,89 (t, 2H, 1', $J = 7,5$), 4,21 (d, 1H, 5', 9', $J = 13,2$), 3,96 (s, 3H, 14), 3,63 (d, 1H, 5', 9', $J = 13,7$), 3,12 (s, 3H, 13), 2,94 – 2,86 (m, 3H, 5', 7', 9'), 2,67 (t, 1H, 2'), 1,64 (dd, 2H, 6', 8', $J = 42,8, 12,4$), 1,37 (s, 9H, 13', 14', 15'), 1,21–1,14 (m, 2H, 6', 8').

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) 168,01 (3'), 162,57 (1), 154,82 (11'), 145,13 (8), 138,32 (9), 133,57 (11), 132,05 (4), 131,11 (7), 123,93 (3), 113,78 (6), 113,30 (5), 112,02 (2), 93,75 (12), 77,63 (12'), 55,97 (14), 47,08 (7'), 43,47 (1'), 40,99 (9'), 39,89 (5'), 32,34 (2'), 32,01 (8'), 31,29 (6'), 28,24 (13', 14', 15'), 19,20 (13).

3.3.3. *Tert*-butil (2-(3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propanamido)etil)karbamat (5)

Amin: *N*-Boc-etilendiamin (0,101 ml, 0,639 mmol).

Trajanje reakcije: 3 h.

Iskorištenje reakcije: 0,020 g (7,35%).

$t_f = 199,7\text{--}201\text{ }^\circ\text{C}$.

ESI-MS (m/z) 427,2 ($M+1$)⁺.

IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3448,76, 3361,88, 3321,01, 3199,80, 2982,89, 1683,46, 1658,84, 1624,98, 1543,20, 1499,63, 1450,32, 1410,49, 1369,05, 1343,13, 1331,24, 1302,14, 1241,97, 1164,20, 1138,27, 1118,44, 1047,99, 977,77, 944,96, 852,81, 830,25, 810,92, 743,12, 559,46 cm^{-1} .

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm, J/Hz) 8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,08 (d, 1H, 3, $J = 8,5$), 7,97 (t, 1H, 4', $J = 5,7$), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$), 7,20 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,88 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$), 6,70 (t, 1H, 7', $J = 5,8$), 4,79 (t, 2H, 1', $J = 7,3$), 3,91 (s, 3H, 14), 3,01 (q, 2H, 5', $J = 6,4$), 2,97 (s, 3H, 13), 2,88 (q, 2H, 6', $J = 6,4$), 2,58 (t, 2H, 2', $J = 7,4$), 1,36 (s, 9H, 10', 11', 12').

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) 169,58 (3'), 160,40 (1,8'), 142,45 (8), 140,50 (9), 137,62 (7), 134,40 (11), 128,51 (4), 122,04 (3), 114,28 (5), 111,91 (6), 108,98 (2), 93,90 (12), 55,41 (14), 40,71 (1', 9'), 38,65 (6', 5'), 36,04 (2'), 28,02 (10', 11', 12'), 22,74 (13).²

3.4. Uklanjanje Boc zaštitne skupine i dobivanje amida (6-8)

Opća metoda:

Suspenziji odgovarajućeg spoja **3-5** u diklormetanu (5 ml) pri 0 °C postupno je dokapana TFA. Reakcijska smjesa miješana je na 0 °C 10 minuta, nakon čega je miješana 25-96 h na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, TFA i diklormetan upareni su pri

² U spektru se ne vidi C1

sniženom tlaku na vodenom vakuumu. Vodena otopina ekstrahirana je pri pH 12 s 1x30 ml diklormetana i 2x40 ml etil-acetata. Organski slojevi su sakupljeni, profiltrirani kroz Phase separator i upareni pod sniženim tlakom. Dobiveno ulje rastrljano je u smjesi dietil-etera i petroletera, te je nastali talog odsisan.

3.4.1. 3-(7-Metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)-*N*-(piperidin-4-il)propanamid (6)

Količina spoja **3**: 0,060 g (0,129 mmol).

Količina TFA: 100 μ L.

Trajanje reakcije: 25 h.

Iskorištenje reakcije: 0,030 g (63,83%).

$t_f = 185,4\text{--}187,2$ °C.

ESI-MS (m/z) 367,1 ($M+1$)⁺.

IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3277,69, 2918,59, 2836,64, 1654,95, 1622,84, 1564,25, 1500,38, 1446,07, 1407,64, 1358,04, 1346,56, 1305,61, 1257,40, 1227,12, 1204,07, 1165,42, 1137,60, 1117,59, 1044,99, 1023,38, 1000,34, 972,83, 830,41, 805,62, 634,68, 557,59, 546,25 cm^{-1} .

¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,1$), 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,86 (d, 1H, 6, $J = 5,1$), 7,77 (d, 1H, 4', $J = 7,7$), 7,19 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,86 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$), 4,78 (t, 3H, 1', $J = 7,0$), 3,90 (s, 3H, 14), 3,54 – 3,48 (m, 1H, 5'), 2,97 (s, 3H, 13), 2,82–2,77 (m, 2H, 7', 9'), 2,57 (t, 2H, 2', $J = 7,0$), 2,41–2,36 (m, 2H, 7', 9'), 1,80 (s, 1H, 8'), 1,48–1,43 (m, 2H, 6', 10'), 1,06–0,98 (m, 2H, 6', 10').

¹³C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) 168,78 (3'), 160,39 (1), 142,57 (8), 140,79 (9), 137,83 (7), 134,56 (11), 128,55 (4), 122,25 (3), 114,31 (5), 112,22 (6), 109,10 (2), 94,04 (12), 55,50 (14), 46,36 (5'), 44,73 (1'), 40,98 (7', 9'), 36,49 (2'), 32,60 (6', 10'), 23,12 (13).

3.4.2. 1-(4-Aminopiperidin-1-il)-3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propan-1-on (7)

Količina spoja **4**: 0,108 g (0,231 mmol).

Količina TFA: 250 μ L.

Trajanje reakcije: 96 h.

Iskorištenje reakcije: 0,026 g (30,59%).

$t_t = 160,4$ - $163,1$ °C.

ESI-MS (m/z) 367,1 ($M+1$)⁺.

IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3349,30, 2926,62, 1616,17, 1564,90, 1498,85, 1445,29, 1406,40, 1355,96, 1321,40, 1297,61, 1243,20, 1225,50, 1165,32, 1136,10, 1116,76, 1094,71, 1041,77, 1018,33, 943,28, 915,99, 873,89, 833,69, 815,64, 712,32, 604,91, 545,94 cm^{-1} .

¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,08 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,2$), 7,20 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,86 (dd, 1H, 2, $J = 8,5$, 2,2), 4,82 (t, 2H, 1', $J = 7,5$), 4,18 (dq, 1H, 5', $J = 13,1$, 3,6), 3,90 (s, 3H, 14), 3,54 (dq, 1H, 9', $J = 13,9$, 3,5), 2,94 (s, 3H, 13), 2,85 – 2,78 (m, 3H, 5', 7', 9'), 2,69 – 2,62 (m, 2H, 2'), 1,61 (dd, 1H, 6', $J = 12,9$, 4,2), 1,47 (dt, 1H, 8', $J = 12,2$, 3,9), 0,98 – 0,91 (m, 1H, 6'), 0,91 – 0,84 (m, 1H, 8').³

¹³C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) 168,14 (3'), 160,52 (1), 142,48 (8), 140,71 (9), 137,82 (7), 134,45 (11), 128,49 (4), 122,31 (3), 114,28 (5), 112,21 (6), 109,35 (2), 93,67 (12), 55,57 (14), 47,77 (7'), 43,47 (1'), 40,83 (9'), 39,80 (5'), 35,27 (8'), 34,63 (6'), 32,67 (2'), 23,11 (13).

3.4.3. N-(2-aminoetil)-3-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propanamid (8)

Količina spoja **5**: 0,151 g (0,354 mmol).

Količina TFA: 340 μ L.

Trajanje reakcije: 92 h.

Iskorištenje reakcije: 0,049 g (42,24%).

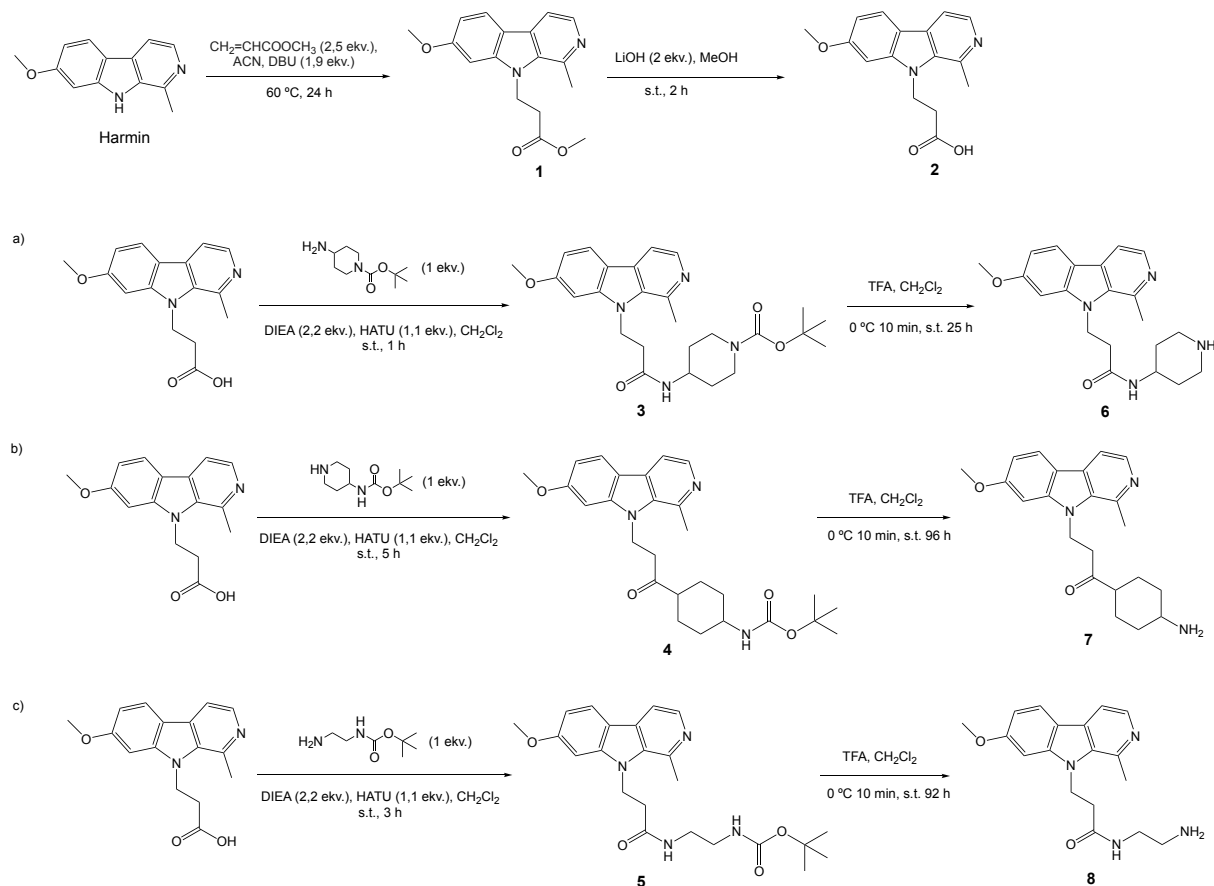
³ U spektru se ne vidi 10' -NH₂

IR (ATR) ν_{max} 3239,83, 3049,28, 2930,22, 1661,79, 1621,99, 1554,82, 1498,19, 1440,83, 1407,02, 1358,08, 1345,98, 1304,92, 1229,75, 1219,89, 1185,28, 1163,74, 1136,43, 1119,25, 1095,40, 1043,31, 1019,90, 977,98, 941,75, 923,40, 812,61, 724,32, 650,46, 624,46, 596,55, 548,72 cm^{-1} .

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm, J/Hz) 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,5$), 7,91 (t, 1H, 4', $J = 5,7$), 7,86 (d, 1H, 6, $J = 5,2$), 7,21 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,86 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$), 4,79 (t, 2H, 1', $J = 7,2$), 3,91 (s, 3H, 14), 3,00 – 2,94 (m, 5H, 5', 13), 2,60 (t, 2H, 2', $J = 7,2$), 2,43 – 2,38 (m, 2H, 6'), 1,62 (s, 2H, 7').

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu sintetizirana su tri potencijalna inhibitora biofilma, amida **6-8**, čija se sinteza odvijala u 4 reakcijska koraka (Shema 1.).



Shema 1. Sinteza potencijalnih inhibitora biofilma **6-8**.

U prvom koraku u reakciji Michaelove adicije između metil-akrilata i dušika u položaju 9 harmina nastaje ester **1**. Dobiveni ester podvrgnut je hidrolizi uz litijev hidroksid, pri čemu je dobivena odgovarajuća kiselina **2**, koja je bila početni spoj u sintezi *N*-Boc zaštićenih amida **3-5**. Upotrebljena su tri različita *N*-Boc zaštićena diamina, 4-amino-1-Boc-piperidin, 4-(*N*-Boc-amino)piperidin i *N*-Boc-etilendiamin. U reakciji *couplinga* navedenih amina s kiselinom **2** uz HATU/DIEA nastali su odgovarajući *N*-Boc zaštićeni amidi **3-5**. U posljednjem reakcijskom koraku uklonjena je Boc zaštitna skupina u kiselim uvjetima, uz TFA, te su dobiveni konačni produkti, amidi **6-8**:

- 3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)-*N*-(piperidin-4-il)propanamid (**6**)

- 1-(4-aminopiperidin-1-il)-3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propan-1-on (**7**)
- *N*-(2-aminoetil)-3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propanamid (**8**)

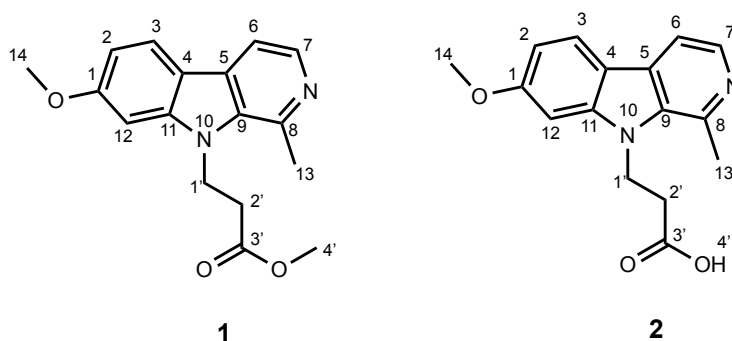
Novim spojevima određena su tališta, a njihove strukture potvrđene su standardnim spektroskopskim i spektrometrijskim tehnikama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS). Zbog ograničene količine spoja, nisu snimljeni svi spektri pojedinih spojeva. Međutim, podaci iz dostupnih spektara nedvojbeno potvrđuju njihove strukture. Analitički i spektroskopski podaci prikazani su u Tablicama 2-7, dok se spektri nalaze u prilogu.

Tablica 2. Analitički, MS i IR spektroskopski podaci za spojeve **1** i **2**.

Spoj	<i>t</i> _f (°C)	Molekulska formula	<i>M</i> _r	MS (<i>m/z</i>)	IR (ATR) <i>ν</i> _{max} (cm ⁻¹)
1	n.o. ¹	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₃	298,34	n.s. ²	n.s. ²
2	229,1-231,1	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₃	284,32	n.s. ²	n.s. ²

¹ n.o. – nije određeno; ² n.s. – nije snimljen.

Tablica 3. ¹H i ¹³C NMR spektroskopski podaci za spojeve **1** i **2**.



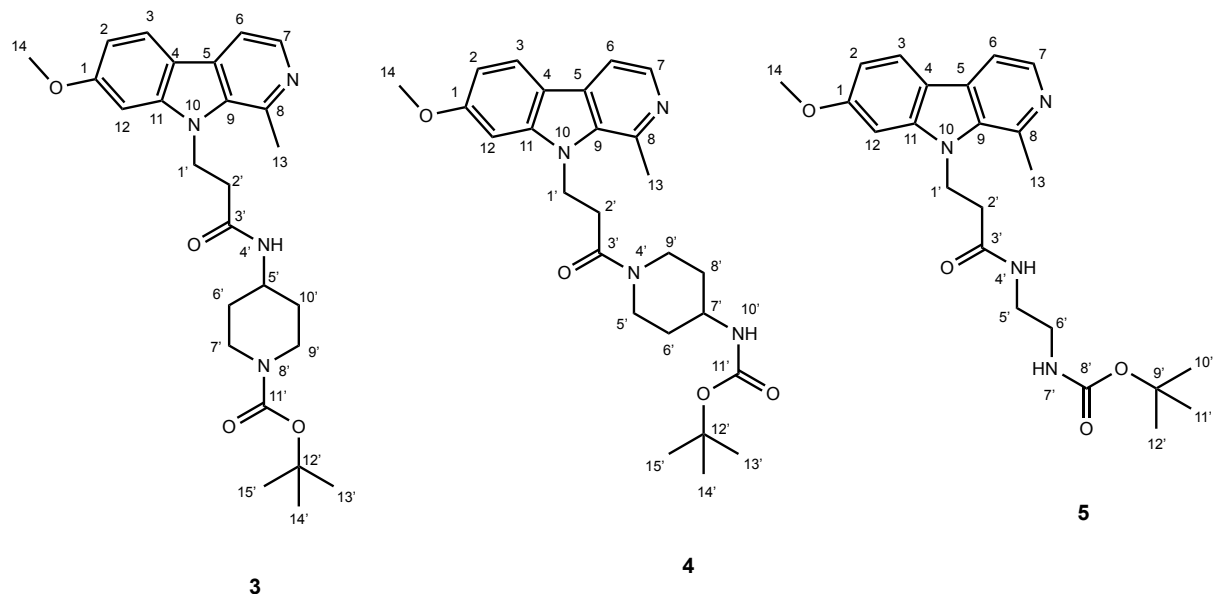
Spoj	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)
1	8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,08 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,2$), 7,23 (d, 1H, 12, $J = 2,1$), 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$, 2,2), 4,87–4,84 (m, 2H, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 3,55 (s, 3H, 4'), 2,95 (s, 3H, 13), 2,86–2,82 (m, 2H, 2') *snimljeno na 400 MHz	171,19 (3'), 160,61 (1), 142,41 (8), 140,64 (9), 137,90 (7), 134,40 (11), 128,63 (4), 122,39 (3), 114,31 (5), 112,25 (6), 109,49 (2), 93,66 (12), 55,61 (14), 51,49 (4'), 40,01 (1'), 34,09 (2'), 22,98 (13)
2	8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,08 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,1$), 7,25 (d, 1H, 12, $J = 1,9$), 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$, 2,0), 4,84–4,81 (m, 2H, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 2,96 (s, 3H, 13), 2,76–2,74 (m, 2H, 2') *u spektru se ne vidi 4' -OH *snimljeno na 600 MHz	172,33 (3'), 160,59 (1), 142,45 (8), 140,63 (9), 137,80 (7), 134,41 (11), 128,60 (4), 122,36 (3), 114,27 (5), 112,25 (6), 109,47 (2), 93,68 (12), 55,57 (14), 40,18 (1'), 34,63 (2'), 22,96 (13)

Tablica 4. Analitički, MS i IR spektroskopski podaci za spojeve **3-5**.

Spoj	t_f (°C)	Molekulska formula	M_r	MS (m/z)	IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1})
3	n.o. ¹	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$	466,58	467,2	n.s. ²
4	211,0-212,7	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$	466,58	467,2	3426,39, 3276,03, 3106,11, 2944,74, 1701,84, 1679,56, 1616,08, 1532,96, 1564,26, 1367,15, 1345,31, 1247,54, 1238,05, 1170,47, 1141,93, 1028,40, 839,56, 815,54, 715,77, 557,20
5	199,7-201,0	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4$	426,52	427,2	3448,76, 3361,88, 3321,01, 3199,80, 2982,89, 1683,46, 1658,84, 1624,98, 1543,20, 1499,63, 1450,32, 1410,49, 1369,05, 1343,13, 1331,24, 1302,14, 1241,97, 1164,20, 1138,27, 1118,44, 1047,99, 977,77, 944,96, 852,81, 830,25, 810,92, 743,12, 559,46

¹ n.o. – nije određeno; ² n.s. – nije snimljen.

Tablica 5. ^1H i ^{13}C NMR spektroskopski podaci za spojeve **3-5**.



Spoj	^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)
3	8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,1$), 7,80 (d, 1H, 4', $J = 7,6$), 7,19 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$, 2,2), 4,79 (t, 2H, 1', $J = 7,0$), 3,90 (s, 3H, 14), 3,70 – 3,60 (m, 3H, 5', 7', 9'), 2,97 (s, 3H, 13), 2,76 (t, 2H, 7', 9', $J = 29,9$), 2,57 (t, 2H, 2', $J = 6,9$), 1,52 – 1,46 (m, 2H, 6', 10'), 1,37 (s, 9H, 13', 14', 15'), 1,04 – 0,96 (m, 2H, 6', 10')	169,02 (3'), 160,41 (11'), 153,86 (1), 142,58 (8), 140,77 (9), 137,79 (7), 134,55 (11), 128,60 (4), 122,29 (3), 114,34 (5), 112,24 (6), 109,09 (2), 94,10 (12), 78,61 (12'), 55,53 (14), 45,45 (5'), 40,92 (1'), 36,47 (6', 7', 9', 10'), 31,04 (2'), 28,05 (13', 14', 15'), 23,08 (13)
4	8,36 (s, 1H, 7), 8,31 (d, 1H, 3, $J = 8,8$), 7,38 (s, 1H, 6), 7,03 (d, 1H, 10', $J = 8,7$), 6,83 (d, 1H, 2, 12, $J = 7,5$), 4,89 (t, 2H, 1', $J = 7,5$), 4,21 (d, 1H, 5', 9', $J = 13,2$), 3,96 (s, 3H, 14), 3,63 (d, 1H, 5', 9', $J = 13,7$), 3,12 (s, 3H, 13), 2,94 – 2,86 (m, 3H, 5', 7', 9'), 2,67 (t, 1H, 2'), 1,64 (dd, 2H, 6', 8', $J = 42,8$, 12,4), 1,37 (s, 9H, 13', 14', 15'), 1,21 – 1,14 (m, 2H, 6', 8')	168,01 (3'), 162,57 (1), 154,82 (11'), 145,13 (8), 138,32 (9), 133,57 (11), 132,05 (4), 131,11 (7), 123,93 (3), 113,78 (6), 113,30 (5), 112,02 (2), 93,75 (12), 77,63 (12'), 55,97 (14), 47,08 (7'), 43,47 (1'), 40,99 (9'), 39,89 (5'), 32,34 (2'), 32,01 (8'), 31,29 (6'), 28,24 (13', 14', 15'), 19,20 (13)
5	8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,08 (d, 1H, 3, $J = 8,5$), 7,97 (t, 1H, 4', $J = 5,7$), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$), 7,20 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,88 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$,	169,58 (3'), 160,40 (1,8'), 142,45 (8), 140,50 (9), 137,62 (7), 134,40 (11), 128,51 (4), 122,04 (3), 114,28 (5), 111,91 (6), 108,98 (2), 93,90 (12),

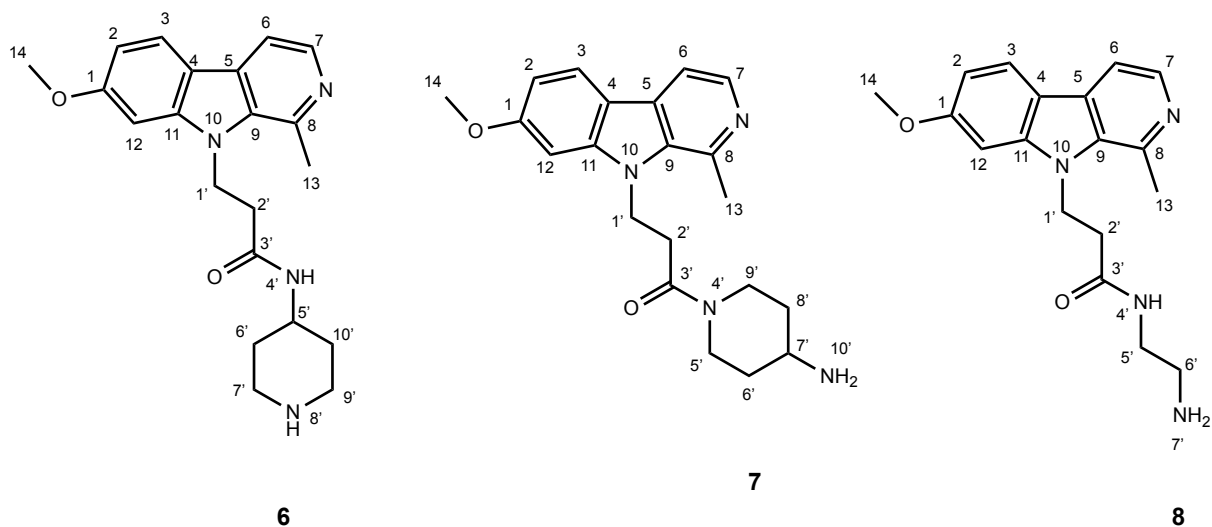
	2,2), 6,70 (t, 1H, 7', $J = 5,8$), 4,79 (t, 2H, 1', $J = 7,3$), 3,91 (s, 3H, 14), 3,01 (q, 2H, 5', $J = 6,4$), 2,97 (s, 3H, 13), 2,88 (q, 2H, 6', $J = 6,4$), 2,58 (t, 2H, 2', $J = 7,4$), 1,36 (s, 9H, 10', 11', 12')	55,41 (14), 40,71 (1', 9'), 38,65 (6', 5'), 36,04 (2'), 28,02 (10', 11', 12'), 22,74 (13) *u spektru se ne vidi C1
--	---	---

Tablica 6. Analitički, MS i IR spektroskopski podaci za spojeve **6-8**.

Spoj	t_f (°C)	Molekulska formula	M_r	MS (m/z)	IR (ATR) $\nu_{\max}$ (cm ⁻¹)
6	184,4-187,2	C ₂₁ H ₂₆ N ₄ O ₂	366,47	367,1	3277,69, 2918,59, 2836,64, 1654,95, 1622,84, 1564,25, 1500,38, 1446,07, 1407,64, 1358,04, 1346,56, 1305,61, 1257,40, 1227,12, 1204,07, 1165,42, 1137,60, 1117,59, 1044,99, 1023,38, 1000,34, 972,83, 830,41, 805,62, 634,68, 557,59, 546,25
7	160,4-163,1	C ₂₁ H ₂₆ N ₄ O ₂	366,47	367,1	3349,30, 2926,62, 1616,17, 1564,90, 1498,85, 1445,29, 1406,40, 1355,96, 1321,40, 1297,61, 1243,20, 1225,50, 1165,32, 1136,10, 1116,76, 1094,71, 1041,77, 1018,33, 943,28, 915,99, 873,89, 833,69, 815,64, 712,32, 604,91, 545,94
8	n.o. ¹	C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₂	326,40	n.s. ²	3239,83, 3049,28, 2930,22, 1661,79, 1621,99, 1554,82, 1498,19, 1440,83, 1407,02, 1358,08, 1345,98, 1304,92, 1229,75, 1219,89, 1185,28, 1163,74, 1136,43, 1119,25, 1095,40, 1043,31, 1019,90, 977,98, 941,75, 923,40, 812,61, 724,32, 650,46, 624,46, 596,55, 548,72

¹ n.o. – nije određeno; ² n.s. – nije snimljen.

Tablica 7. ^1H i ^{13}C NMR spektroskopski podaci za spojeve **6-8**.



Spoj	^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)
6	8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,1$), 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,86 (d, 1H, 6, $J = 5,1$), 7,77 (d, 1H, 4', $J = 7,7$), 7,19 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,86 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$, 2,2), 4,78 (t, 3H, 1', $J = 7,0$), 3,90 (s, 3H, 14), 3,54 – 3,48 (m, 1H, 5'), 2,97 (s, 3H, 13), 2,82 – 2,77 (m, 2H, 7', 9'), 2,57 (t, 2H, 2', $J = 7,0$), 2,41 – 2,36 (m, 2H, 7', 9'), 1,80 (s, 1H, 8'), 1,48 – 1,43 (m, 2H, 6', 10'), 1,06 – 0,98 (m, 2H, 6', 10')	168,78 (3'), 160,39 (1), 142,57 (8), 140,79 (9), 137,83 (7), 134,56 (11), 128,55 (4), 122,25 (3), 114,31 (5), 112,22 (6), 109,10 (2), 94,04 (12), 55,50 (14), 46,36 (5'), 44,73 (1'), 40,98 (7', 9'), 36,49 (2'), 32,60 (6', 10'), 23,12 (13)
7	8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,08 (d, 1H, 3, $J = 8,6$), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,2$), 7,20 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,86 (dd, 1H, 2, $J = 8,5$, 2,2), 4,82 (t, 2H, 1', $J = 7,5$), 4,18 (dq, 1H, 5', $J = 13,1$, 3,6), 3,90 (s, 3H, 14), 3,54 (dq, 1H, 9', $J = 13,9$, 3,5), 2,94 (s, 3H, 13), 2,85 – 2,78 (m, 3H, 5', 7', 9'), 2,69 – 2,62 (m, 2H, 2'), 1,61 (dd, 1H, 6', $J = 12,9$, 4,2 Hz), 1,47 (dt, 1H, 8', $J = 12,2$, 3,9), 0,98 – 0,91 (m, 1H, 6'), 0,91 – 0,84 (m, 1H, 8')	168,14 (3'), 160,52 (1), 142,48 (8), 140,71 (9), 137,82 (7), 134,45 (11), 128,49 (4), 122,31 (3), 114,28 (5), 112,21 (6), 109,35 (2), 93,67 (12), 55,57 (14), 47,77 (7'), 43,47 (1'), 40,83 (9'), 39,80 (5'), 35,27 (8'), 34,63 (6'), 32,67 (2'), 23,11 (13)
8	8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$), 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,5$), 7,91 (t, 1H, 4', $J = 5,7$), 7,86 (d, 1H, 6, $J = 5,2$),	n.s. ¹

*u spektru se ne vidi 10'-NH₂

	7,21 (d, 1H, 12, $J = 2,2$), 6,86 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$, 2,2), 4,79 (t, 2H, 1', $J = 7,2$), 3,91 (s, 3H, 14), 3,00 – 2,94 (m, 5H, 5', 13), 2,60 (t, 2H, 2', $J =$ 7,2), 2,43 – 2,38 (m, 2H, 6'), 1,62 (s, 2H, 7')	
--	---	--

¹n.s. – nije snimljen.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu sintetizirana su tri spoja s potencijalnim inhibicijskim djelovanjem na bakterijski biofilm:

- 3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)-*N*-(piperidin-4-il)propanamid (**6**)
- 1-(4-aminopiperidin-1-il)-3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propan-1-on (**7**)
- *N*-(2-aminoetil)-3-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)propanamid (**8**).

Spojevima su određena tališta, a njihove strukture potvrđene su standardnim spektroskopskim i spektrometrijskim tehnikama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS). U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovoga rada, bit će ispitano njihovo inhibitorno djelovanje na bakterijski biofilm.

6. LITERATURA

- Beus, M., Savijoki, K., Patel, J. Z., Yli-Kauhaluoma, J., Fallarero, A. i Zorc, B. Chloroquine fumardiamides as novel quorum sensing inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2020, 30, 127336.
- Brackman, G. i Coenye, T. Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 21, 5-11.
- Chen, M., Yu, Q. i Sun, H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14, 18488-18501.
- De Kievit, T. Biofilms. *Comprehensive Biotechnology*, 2011, 1, 529-540.
- Dickey, S., Cheung, G. i Otto, M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16, 457–471.
- Geske, G. D., O'Neill, J. C., Miller, D. M., Mattmann, M. E. i Blackwell, H. E. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: Systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129, 13613–13625.
- Hirakawa, H. i Tomita, H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: A new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4, 114.
- Kaur, G., Balamurugan, P., Vasudevan, S., Jadav, S. i Princy, S. A. Antimicrobial and antibiofilm potential of acyclic amines and diamines against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, 1767.
- Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N. i Mahadik, K. R. Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 2009, 8, 159-168.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P. i Hall-Stoodley, L. Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15, 740–755.

- Lee, J. i Zhang, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell*, 2015, 6, 26–41.
- Majik, M. i Parvatkar, P. Next Generation Biofilm Inhibitors for *Pseudomonas aeruginosa*: Synthesis and Rational Design Approaches. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, 14, 81–109.
- Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A. i Ton-That, H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in Microbiology*, 2008, 16, 33-40.
- Nenaah, G. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, 2010, 81, 779-782.
- Pang, Y. Y., Schwartz, J., Thoendel, M., Ackermann, L. W., Horswill, A. R. i Nauseef, W. M. Agr-dependent interactions of *Staphylococcus aureus* USA300 with human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Innate Immunity*, 2010, 2, 546-559.
- Parrino, B., Schillaci, D., Carnevale, I., Giovannetti, E., Diana, P., Cirrincione, G. i Cascioferro, S. Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 161, 154–178.
- Peng, X., Zhang, Y., Bai, G., Zhou, X. i Wu, H. Cyclic di-AMP mediates biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 2016, 99, 945-959.
- Peterson, B. W., He, Y., Ren, Y., Zerdoum, A., Libera, M. R., Sharma, P. K., van Winkelhoff, A.-J., Neut, D., Stoodley, P., van der Mei, H. C. i Busscher, H. J. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39, 234–245.
- Rasko, D. A. i Sperandio, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9, 117–128.

- Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E. i Daudé, D. Interference in bacterial quorum sensing: A biopharmaceutical perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 3, 203.
- Renner, L. D. i Weibel, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*, 2011, 36, 347-355.
- Reuter, K., Steinbach, A. i Helms, V. Interfering with bacterial quorum sensing. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 2016, 8, 1-15.
- Römling, U. i Balsalobre, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 2012, 272, 541-561.
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G. i Tiwari, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 2018, 9, 522-554.
- Tang, K. i Zhang, X. H. Quorum quenching agents: Resources for antivirulence therapy. *Marine Drugs*, 2014, 12, 3245-3282.
- Ton-That, H., Marraffini, L. A. i Schneewind, O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2004, 1694, 269-278.
- Valentini, M. i Filloux, A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291, 12547–12555.
- Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G. i Yarlagadda, P. K. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 2014, 228, 1083-1099.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C. i Cámara, M. Look who's talking: Communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society*

B: Biological Sciences, 2007, 362, 1119–1134.

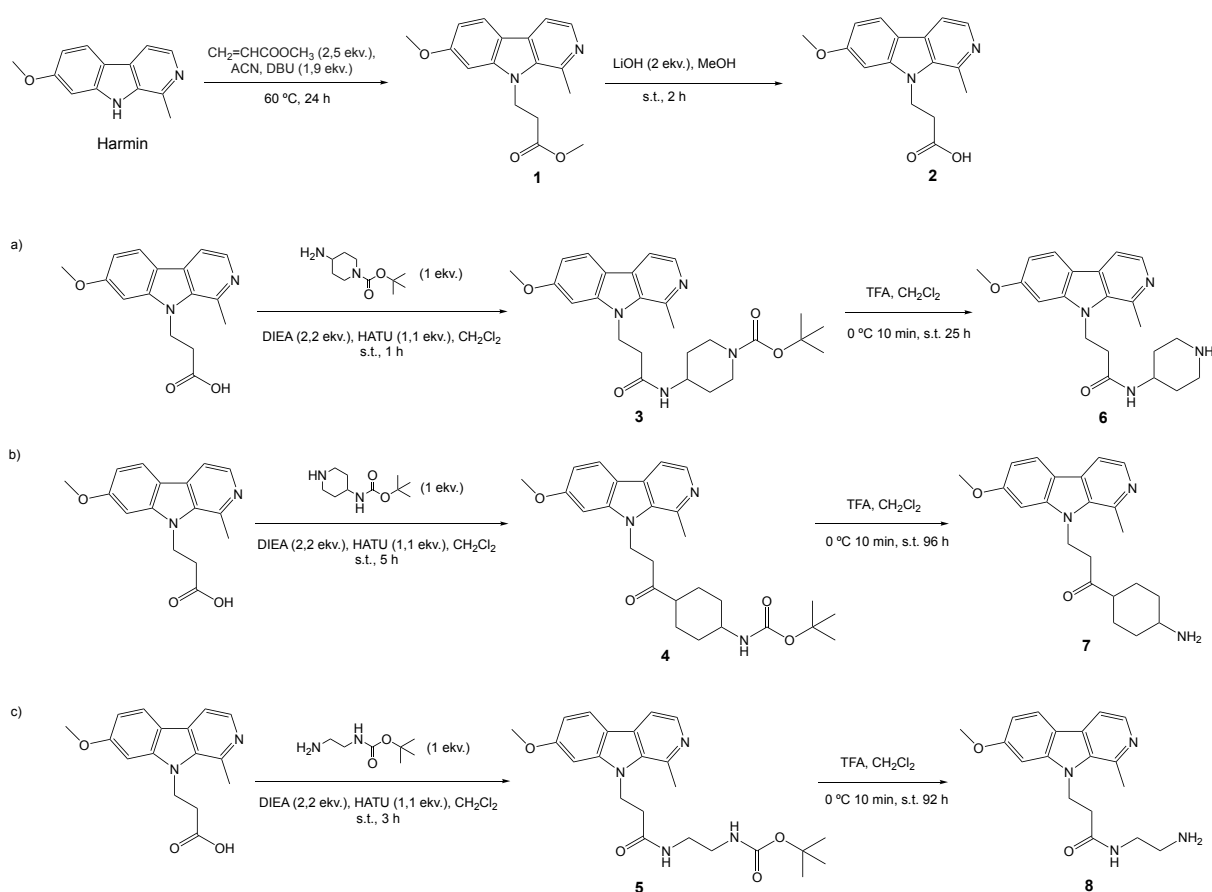
Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Song, Z., Høiby, N., Molin, S. i Givskov, M. Combating biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2012, 65, 146-157.

Zhang, W. i Li, C. Exploiting quorum sensing interfering strategies in gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 6, 1535.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Biofilm je zajednica različitih vrsta mikroorganizama koji su uklopljeni u matriks. Matriks predstavlja fizičku barijeru koja otežava penetraciju antibiotika do ciljnih stanica, a s druge strane, zbog viskoelastičnosti otežano je mehaničko uklanjanje. Navedeno čini biofilm kako zdravstvenim, tako i industrijskim problemom s obzirom da se može formirati na bilo kojoj metalnoj ili plastičnoj površini.

U ovom radu sintetizirana su tri potencijalna inhibitora biofilma (**6-8**). Sinteza se odvijala u četiri koraka, a kao početni spoj uzet je harmin. U prvom koraku sinteze Michaelovom adicijom dobiven je ester **1**. U idućem koraku u reakciji hidrolize dobivena je kiselina **2**. U trećem koraku sinteze reakcijom *couplinga* između kiseline **2** i odgovarajućeg amina (4-amino-1-Boc-piperidina, 4-(*N*-Boc-amino)piperidina ili *N*-Bocetilendiamina), uz HATU/DIEA dobiveni su *N*-Boc zaštićeni amidi (**3-5**). Boc zaštitna skupina uklonjena je u kiselim uvjetima, uz TFA, te su dobiveni odgovarajući amidi (**6-8**).

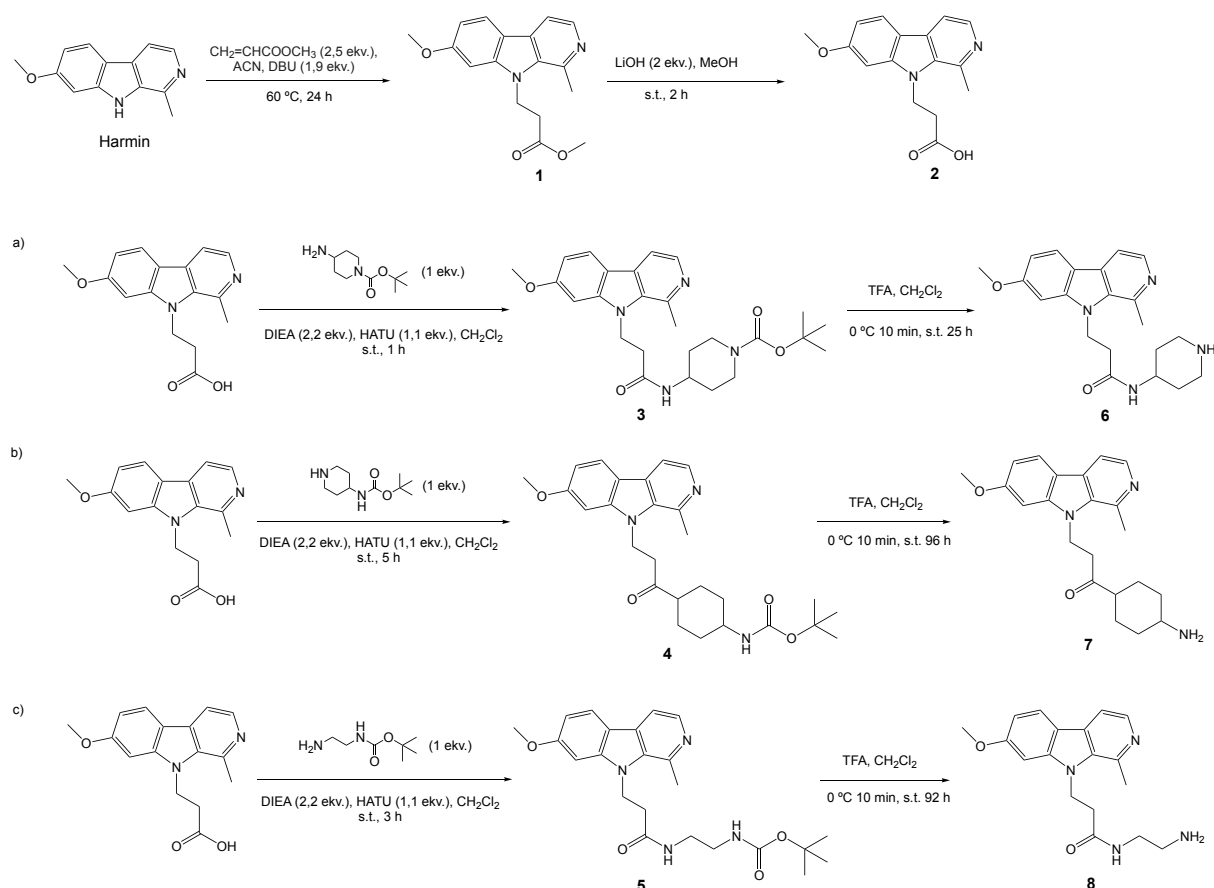


Spojevima su određena su tališta, a njihove strukture potvrđene su standardnim spektroskopskim i spektrometrijskim tehnikama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS). U daljnjim istraživanjima, bit će ispitano njihovo inhibitorno djelovanje na bakterijski biofilm.

Ključne riječi: harmin, biofilm, *coupling*, sinteza.

Biofilm is a community consisting of various types of microorganisms embedded in extracellular matrix, which represents a physical barrier that complicates antibiotic penetration to target bacteria. Furthermore, mechanical removal is complicated due to viscoelastic properties of biofilm. Aforementioned makes biofilm a major healthcare, as well as industrial problem, due to the fact that it can be formed on any metal or plastic surface.

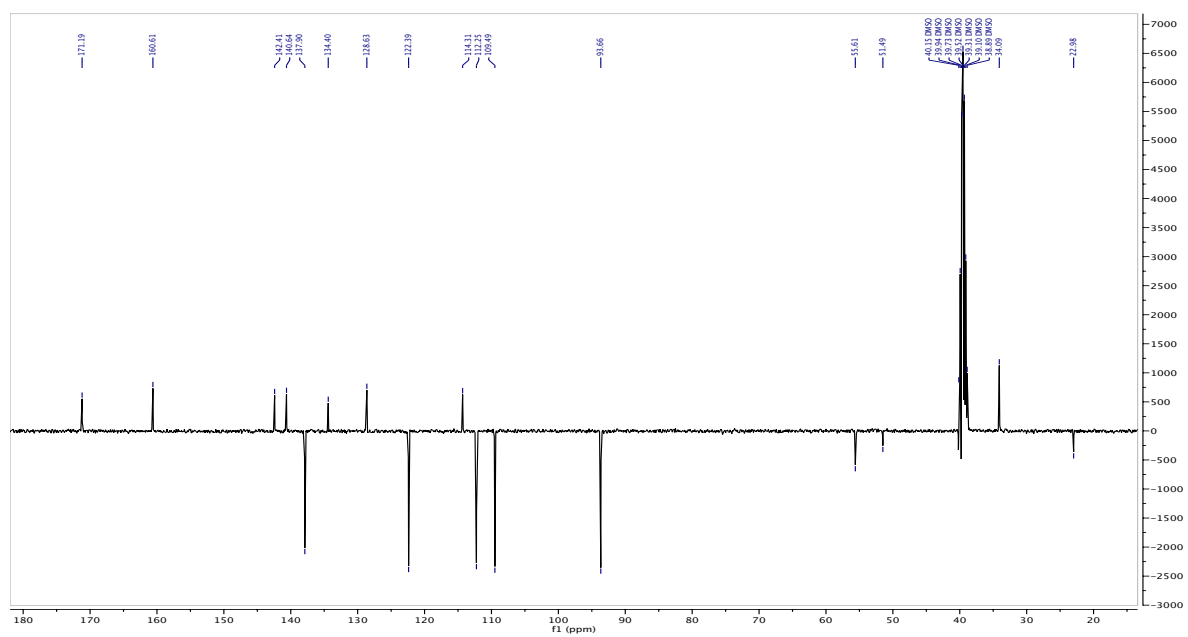
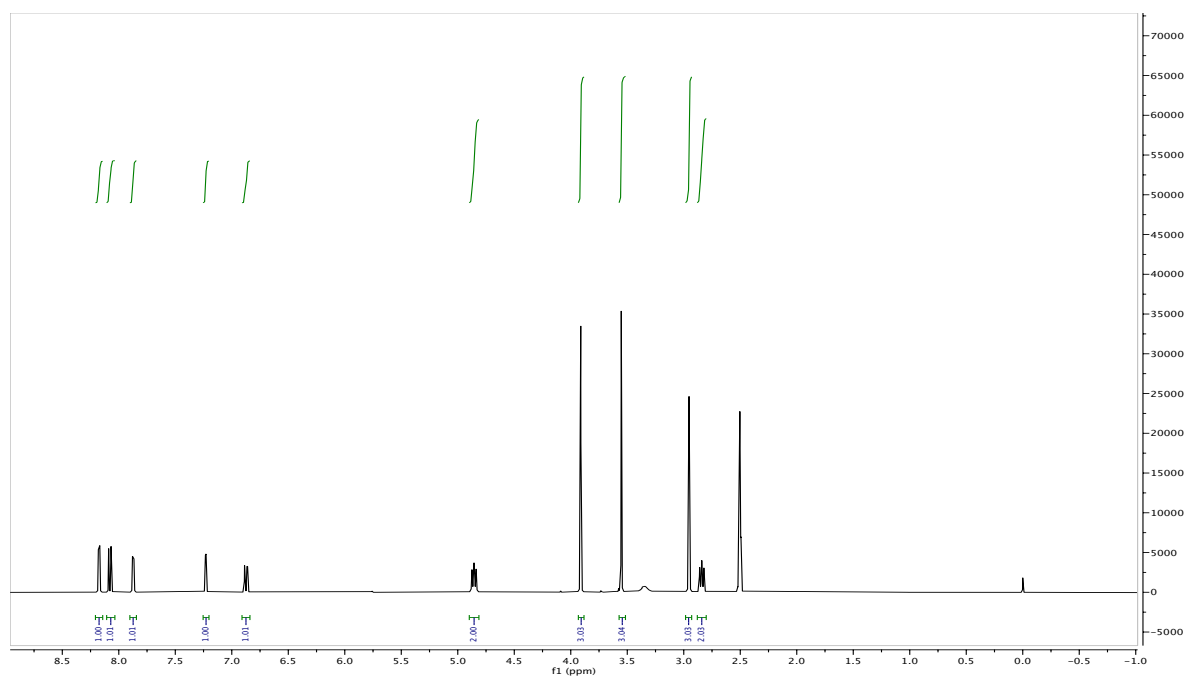
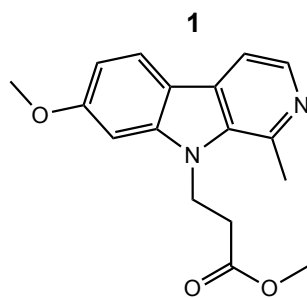
Three potential biofilm inhibitors have been synthesized (**6-8**). Synthesis was done in a four step procedure using harmine as a starting compound. The first step included Michael reaction resulting in ester **1**, which was subsequently hydrolysed to give acid **2**. The third step included *coupling* reaction between acid **2** and corresponding amine (4-amino-1-Boc-piperidine, 4-(*N*-Boc-amino)piperidine or *N*-Boc-ethylenediamine), in the presence of HATU/DIEA, resulting in *N*-Boc protected amides (**3-5**). Boc protective group was removed under acid conditions, (TFA), to yield final compounds, amides (**6-8**).

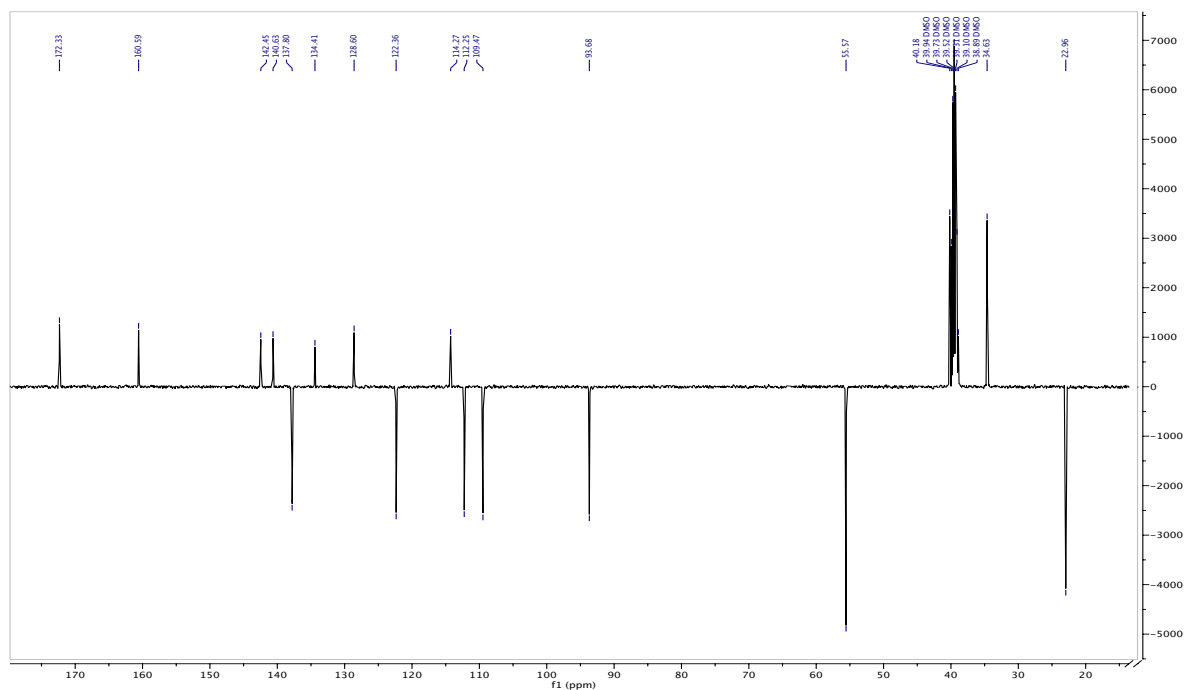
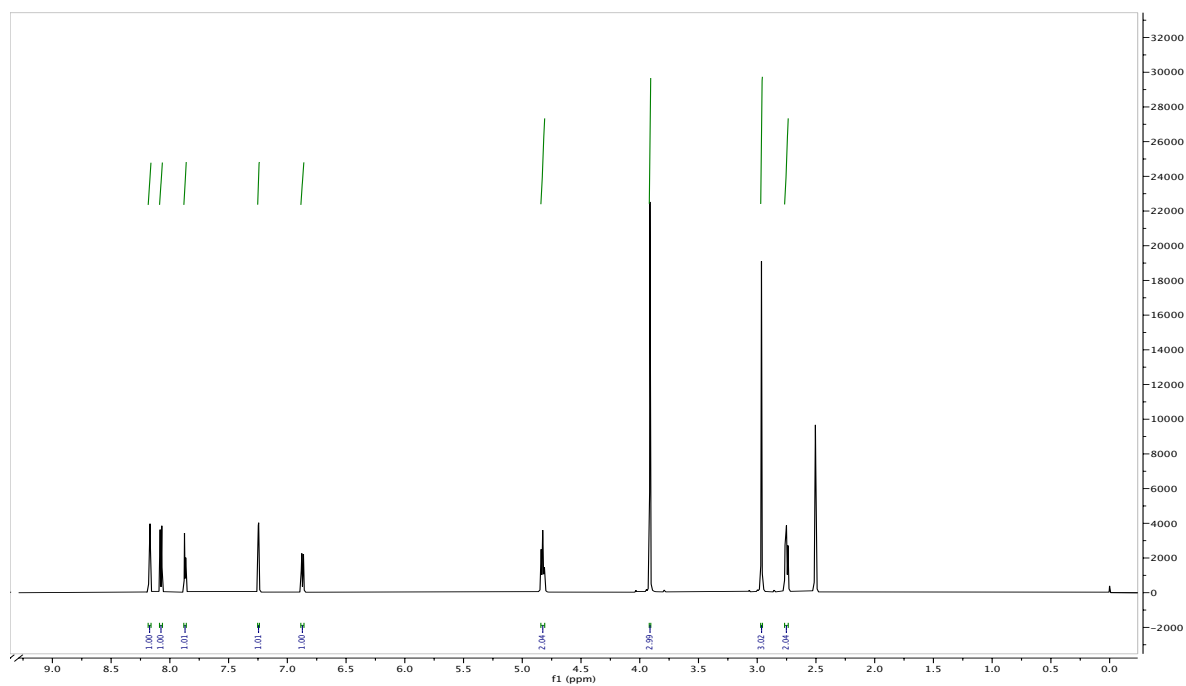
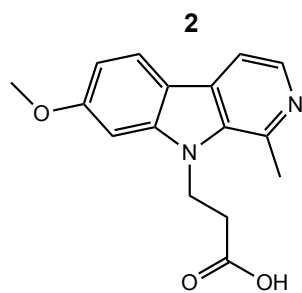


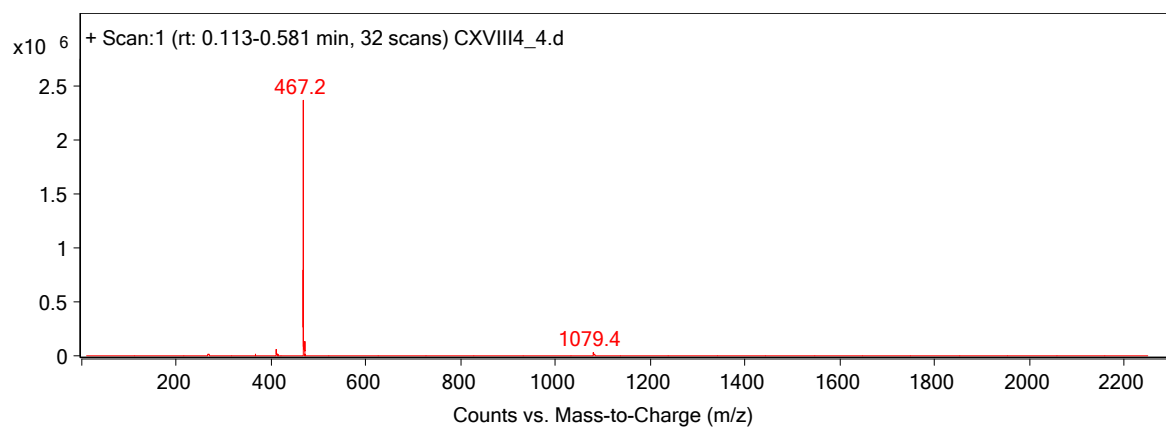
Melting points of new compounds were determined and their structures were confirmed using standard spectroscopic and spectrometric techniques (IR, ^1H and ^{13}C NMR, MS). Their inhibitory activity on bacterial biofilm will be tested in further studies.

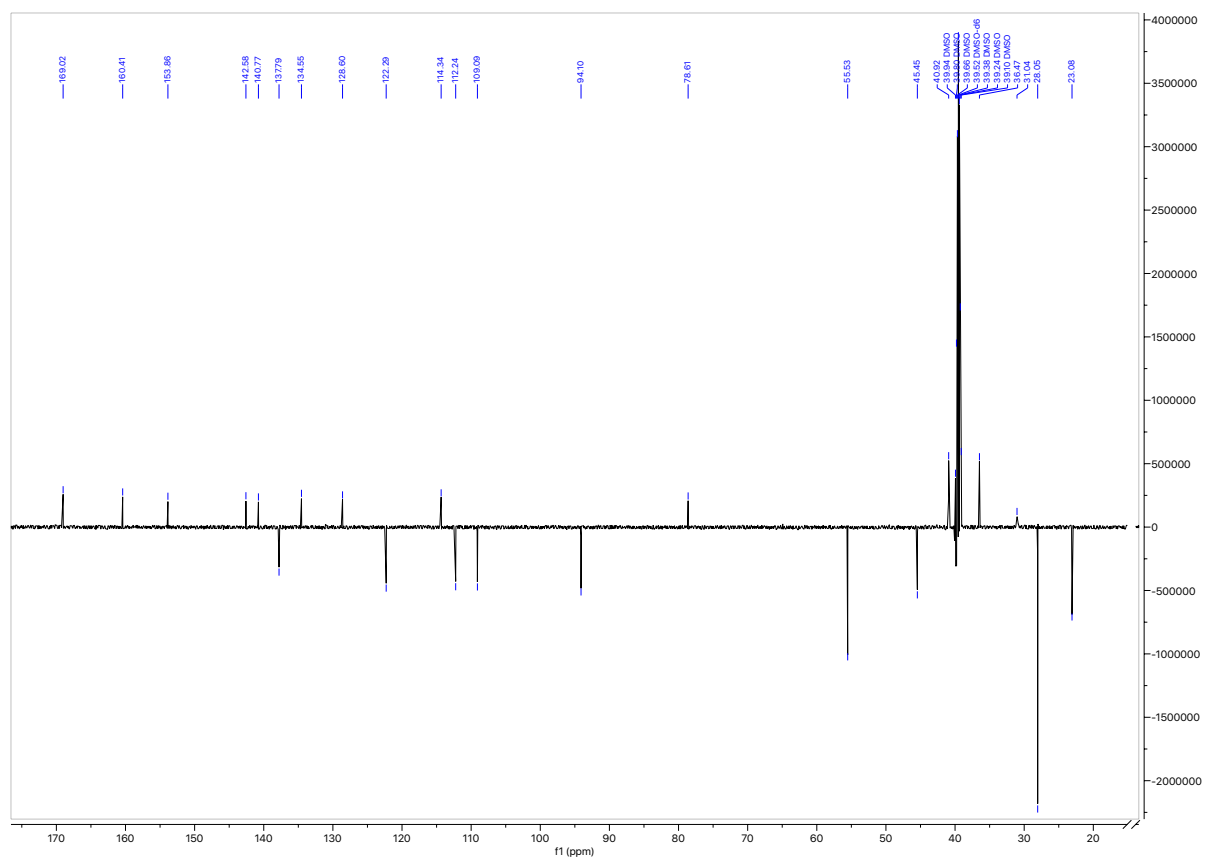
Keywords: harmine, biofilm, *coupling*, synthesis.

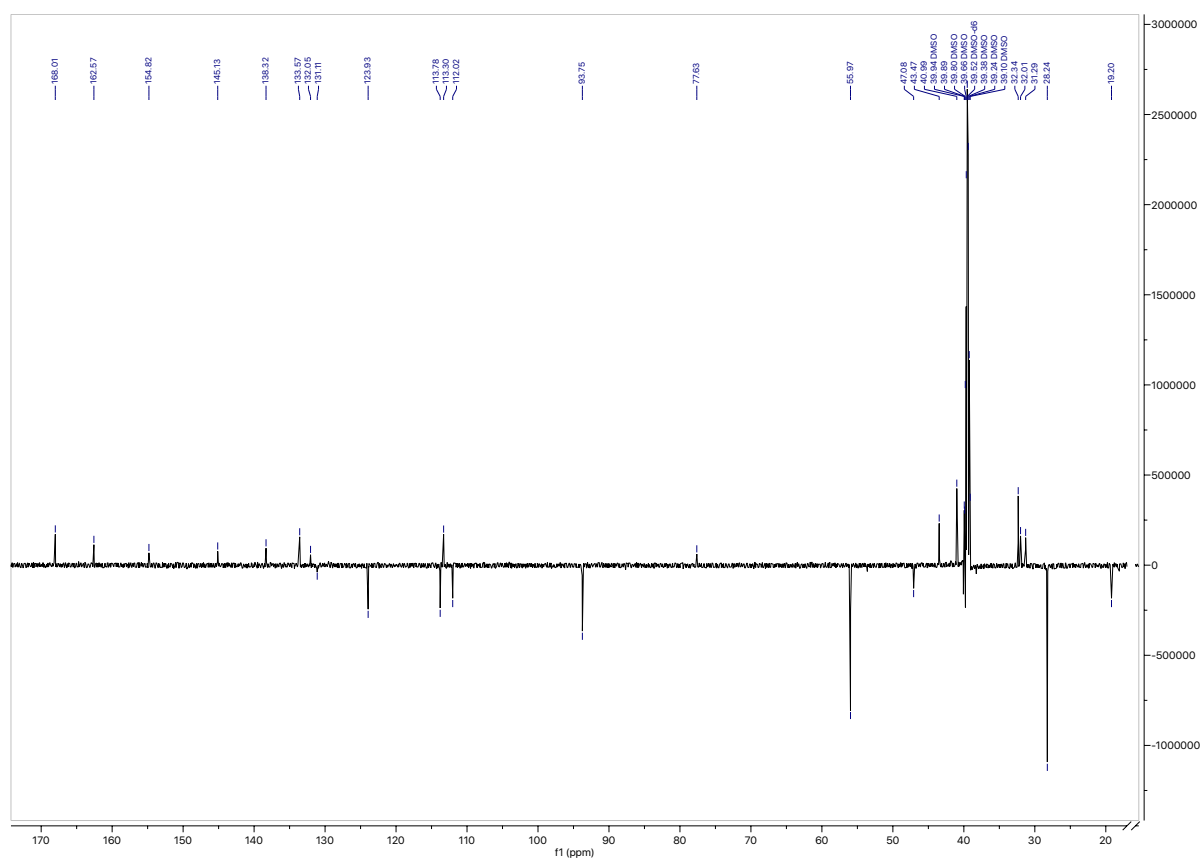
8. PRILOZI

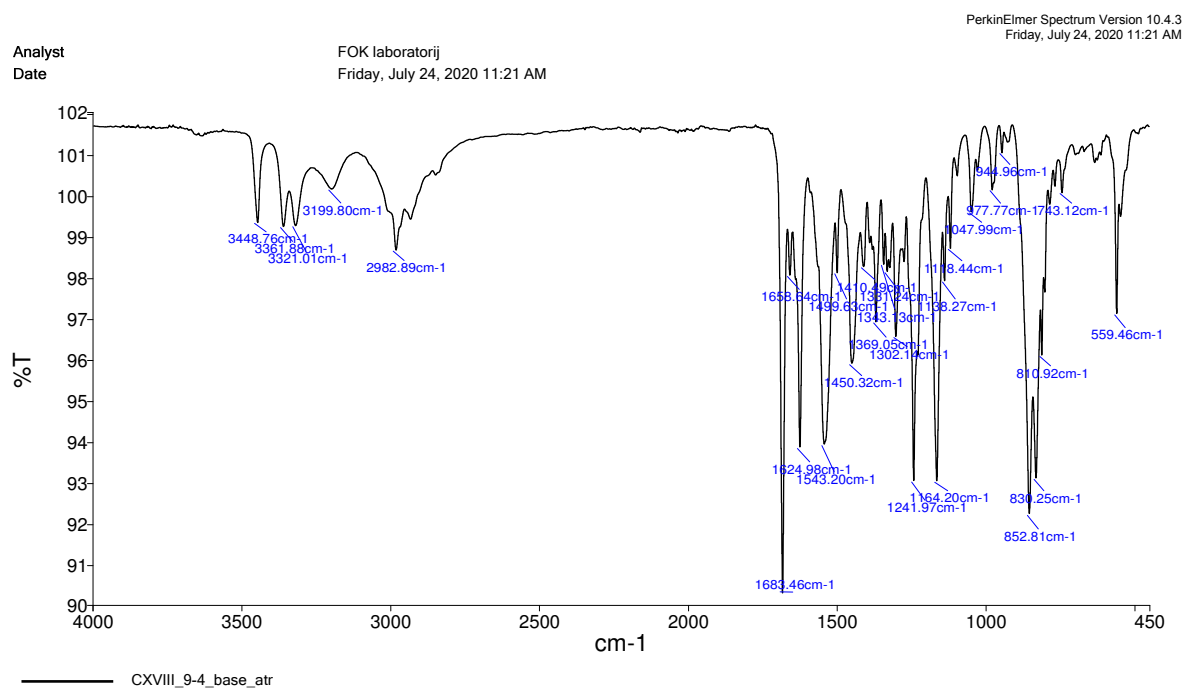
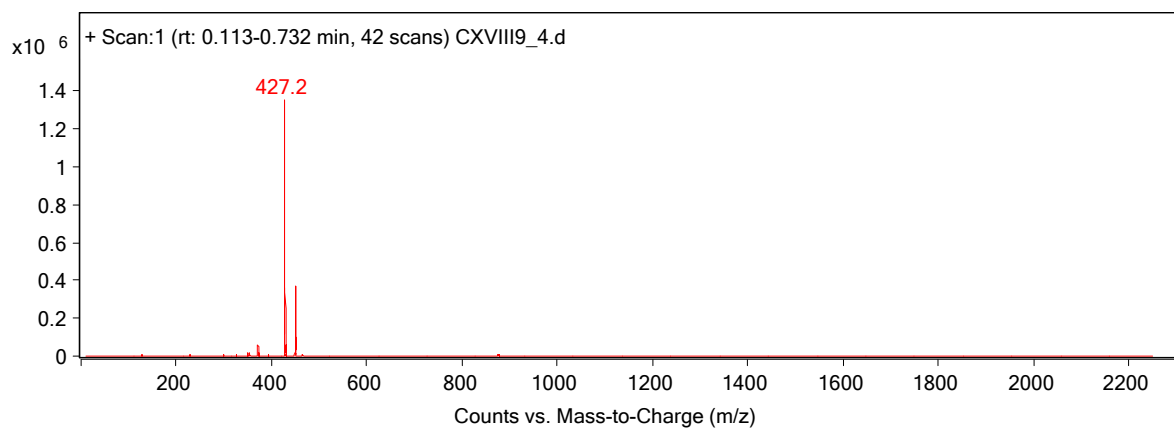
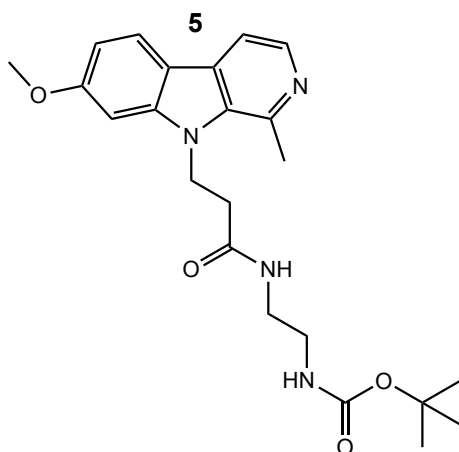


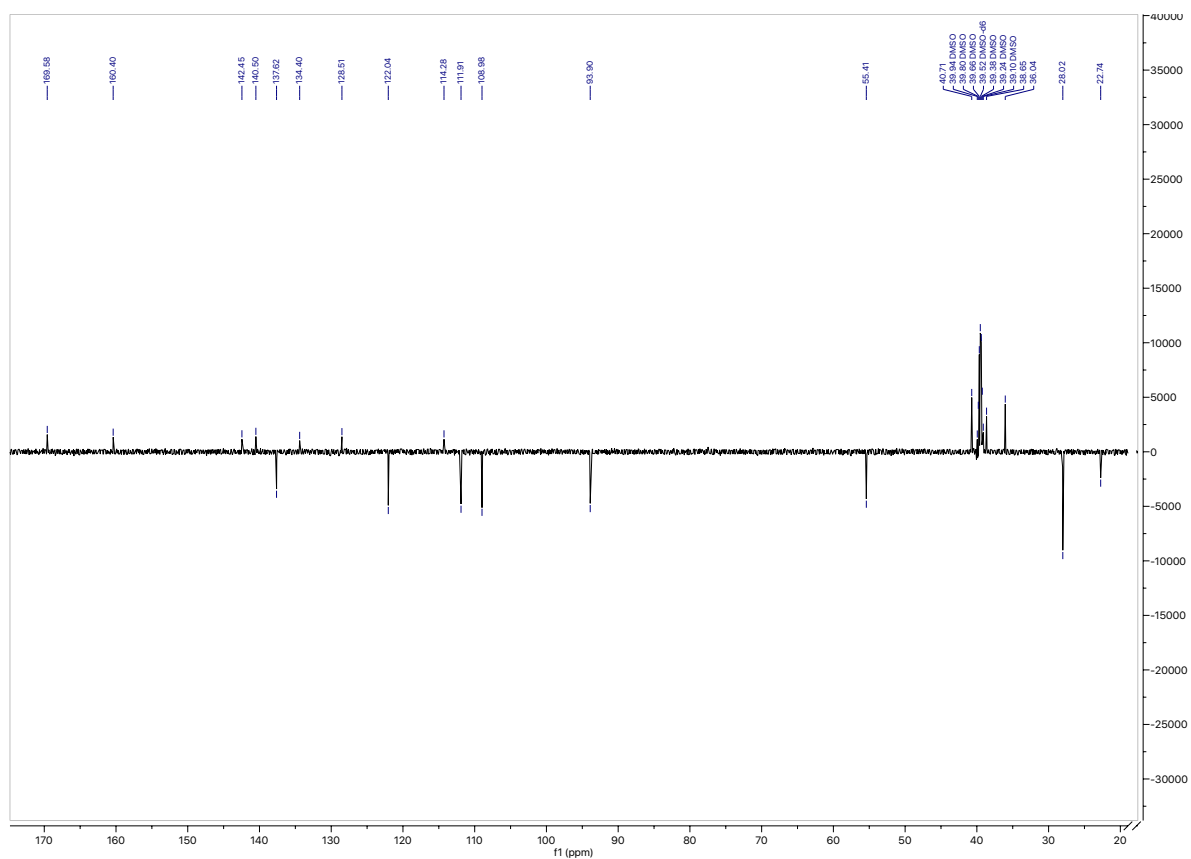
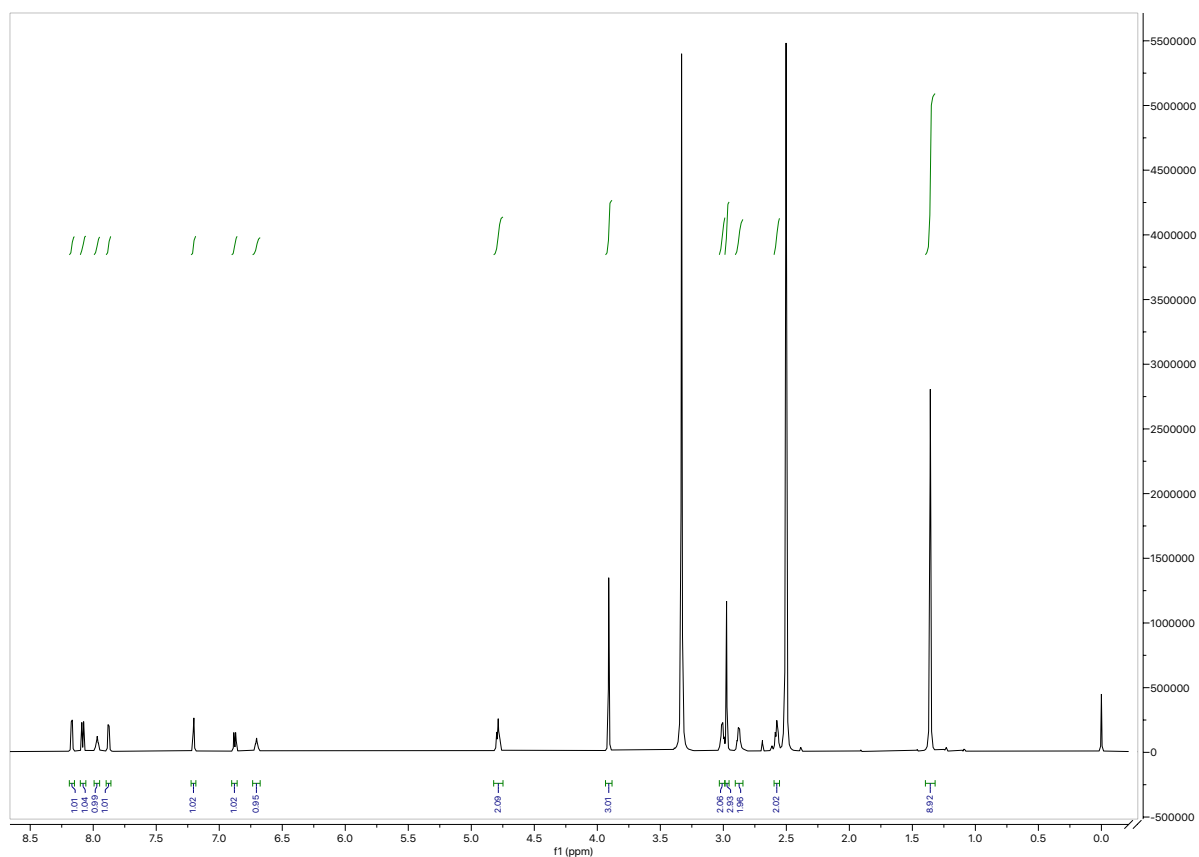


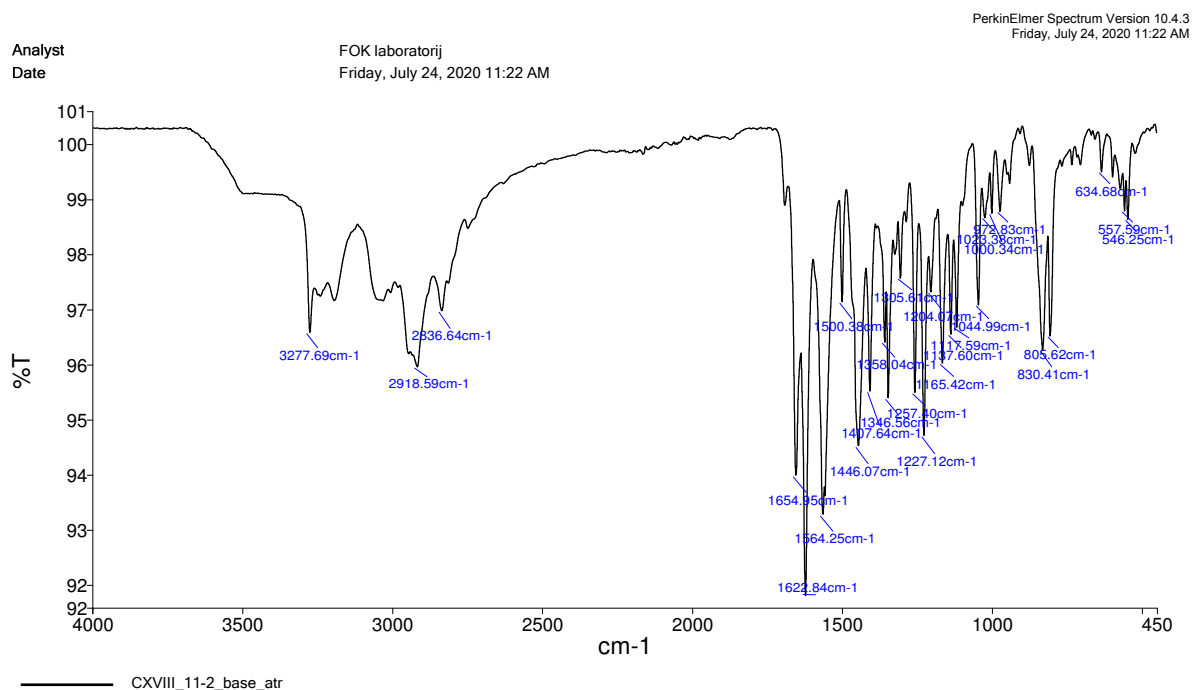
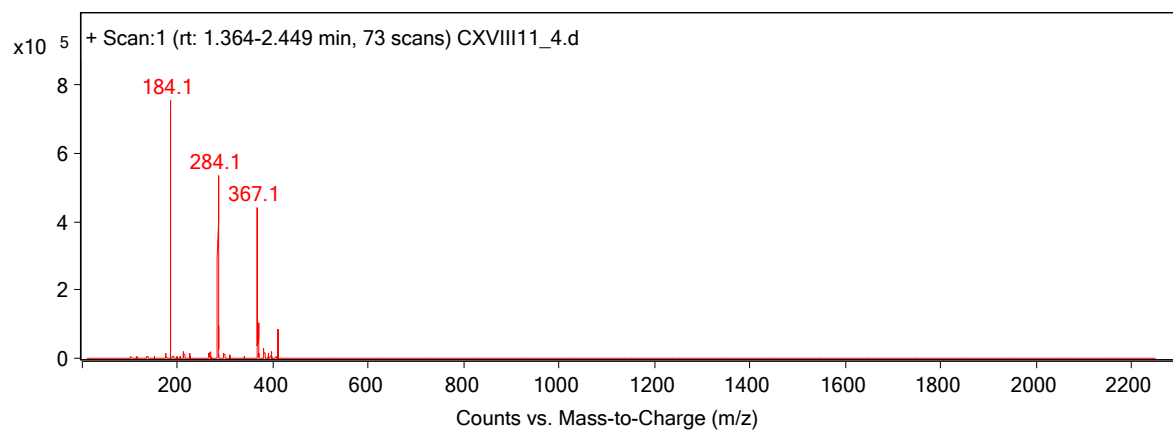
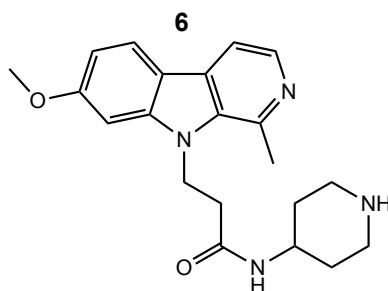


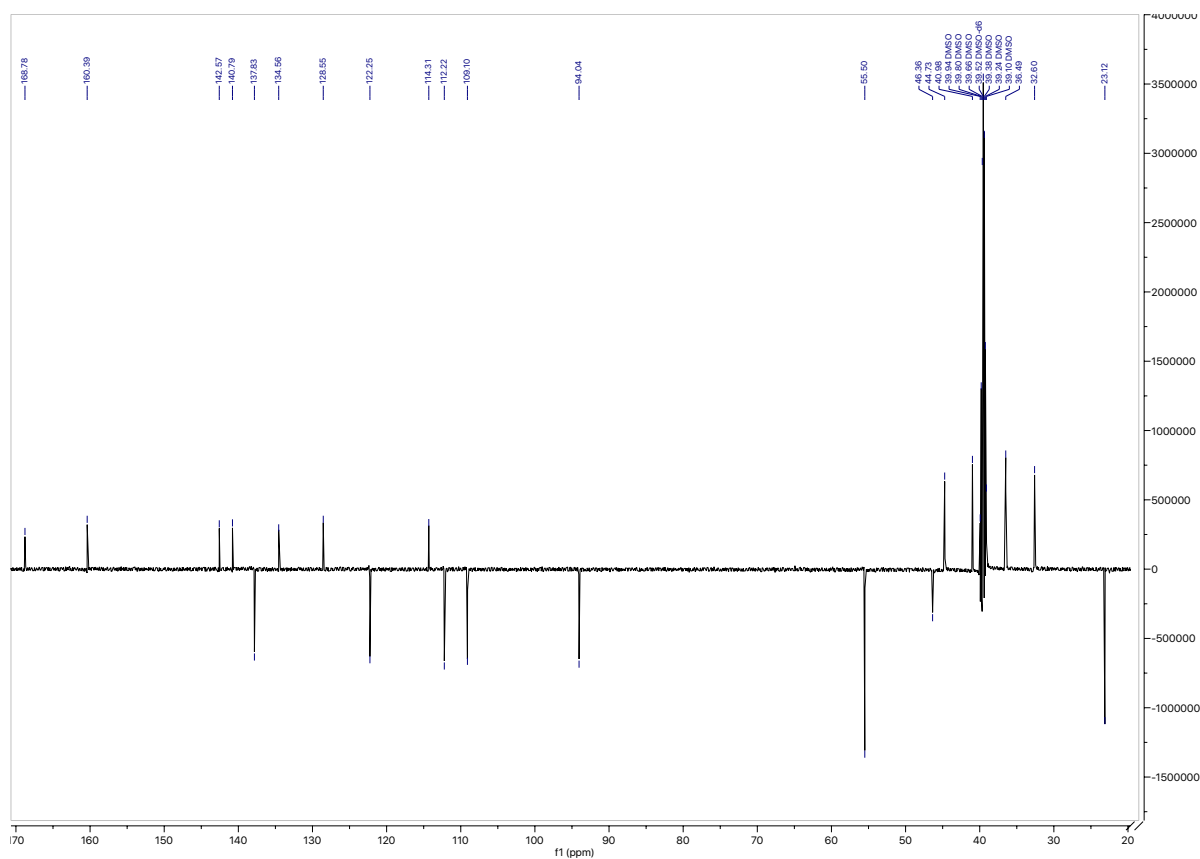
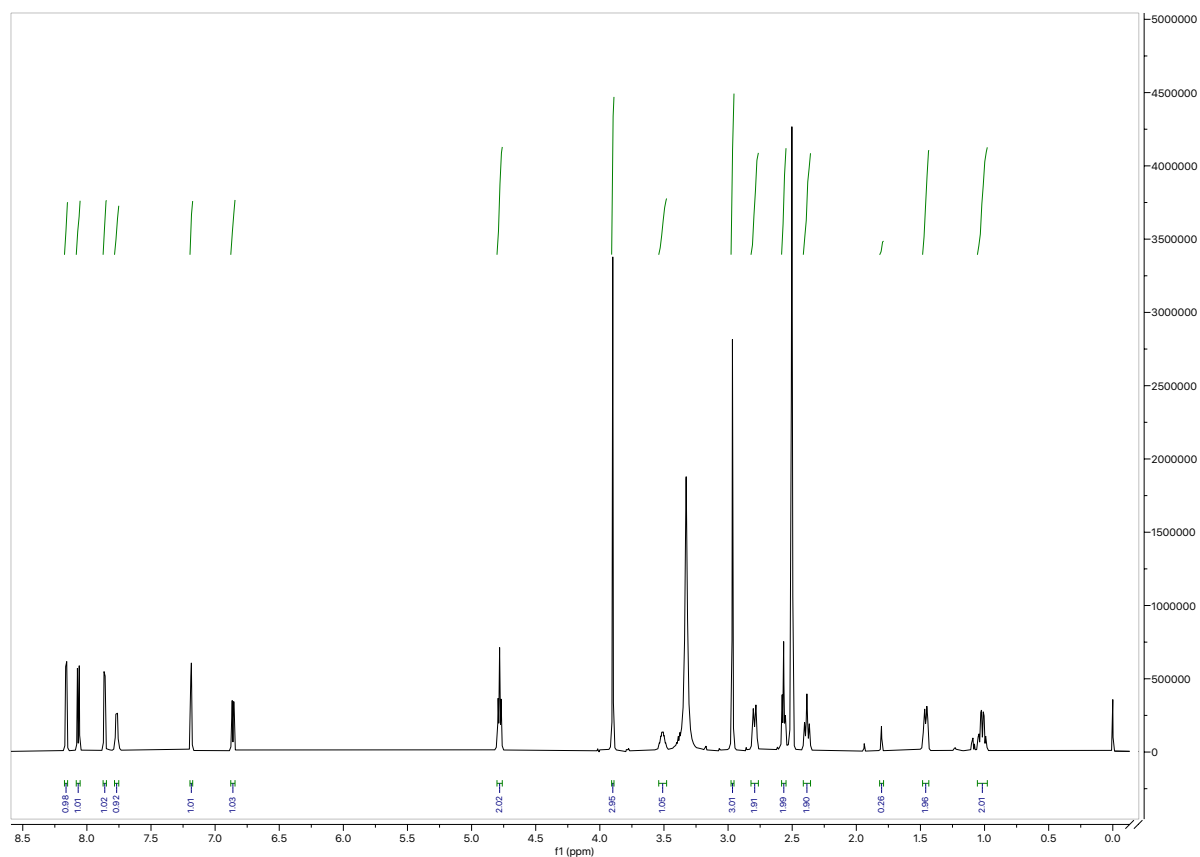


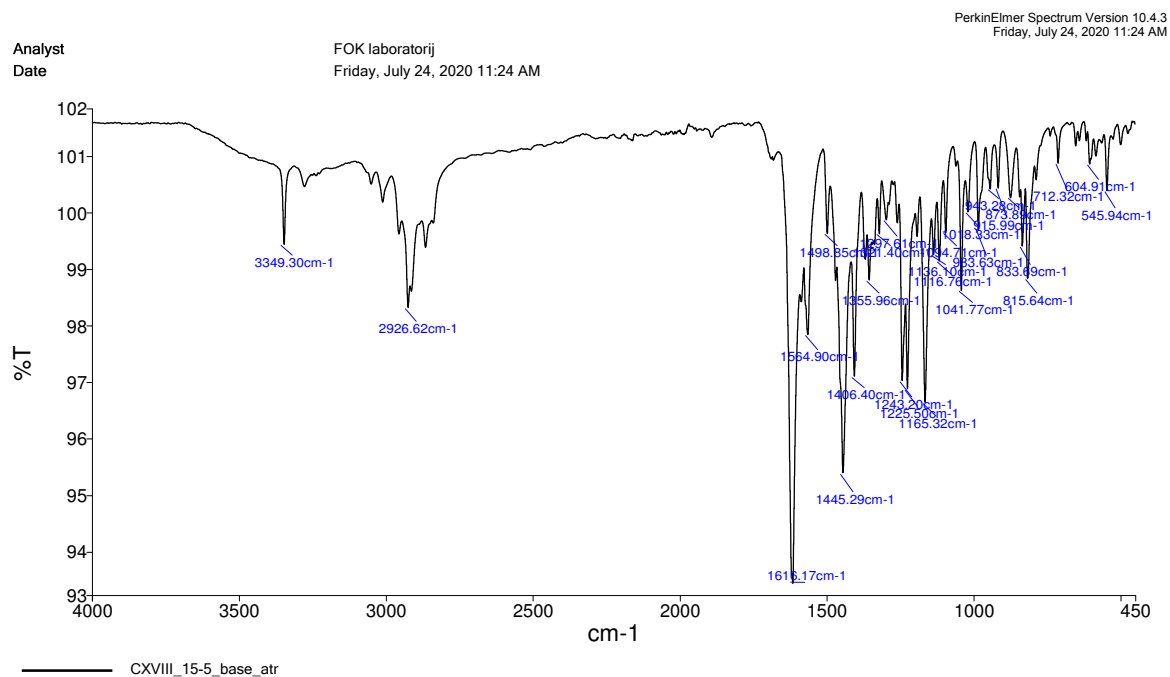
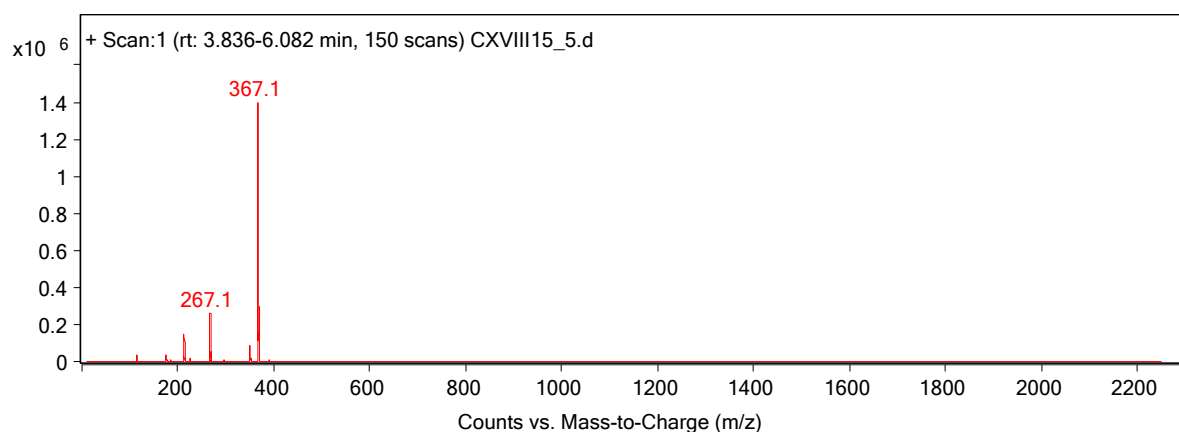
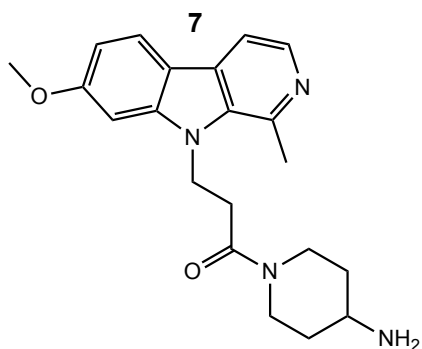


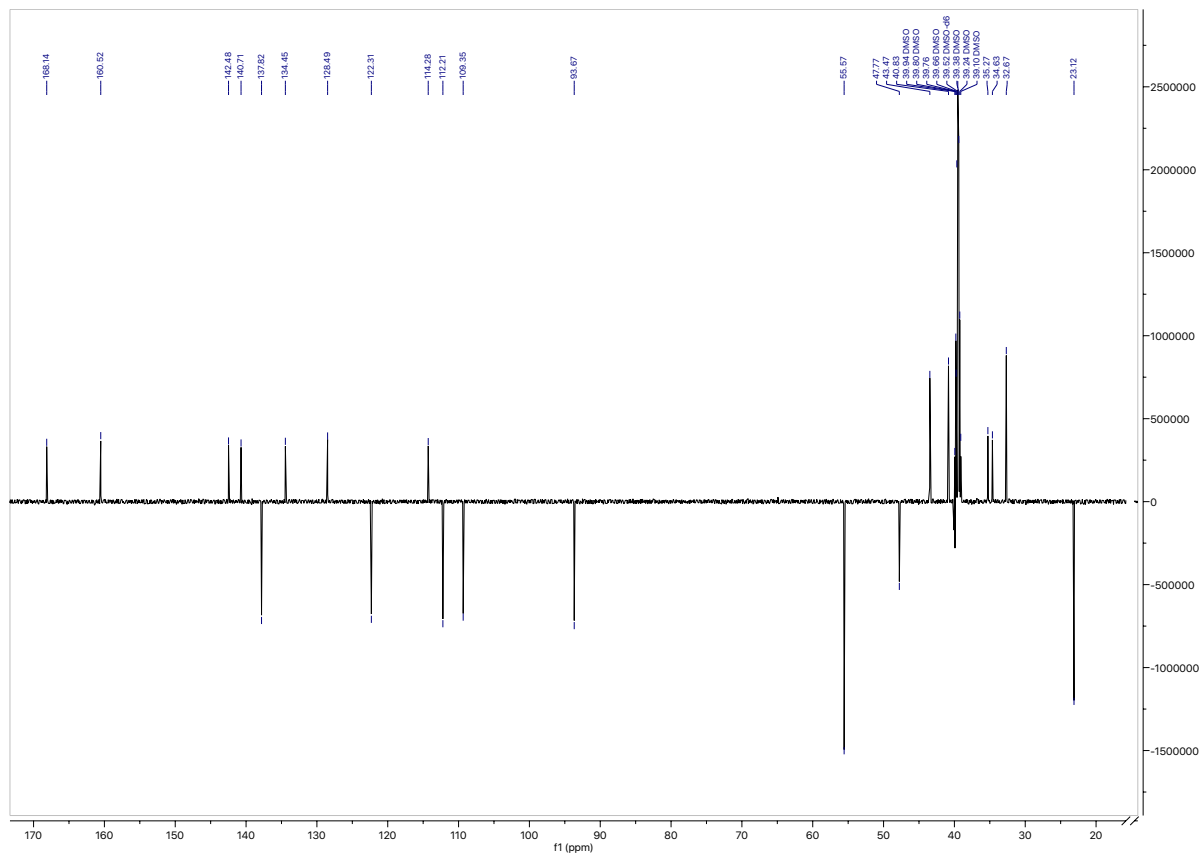
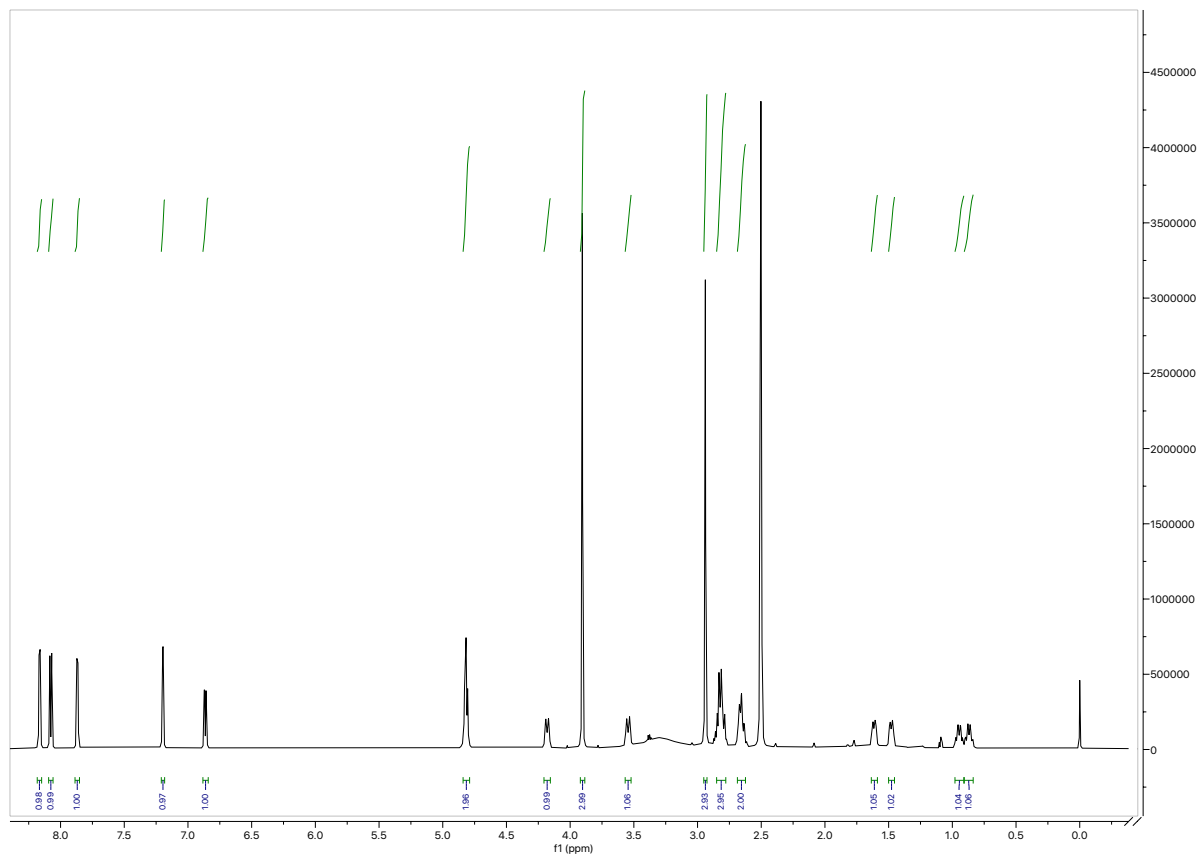


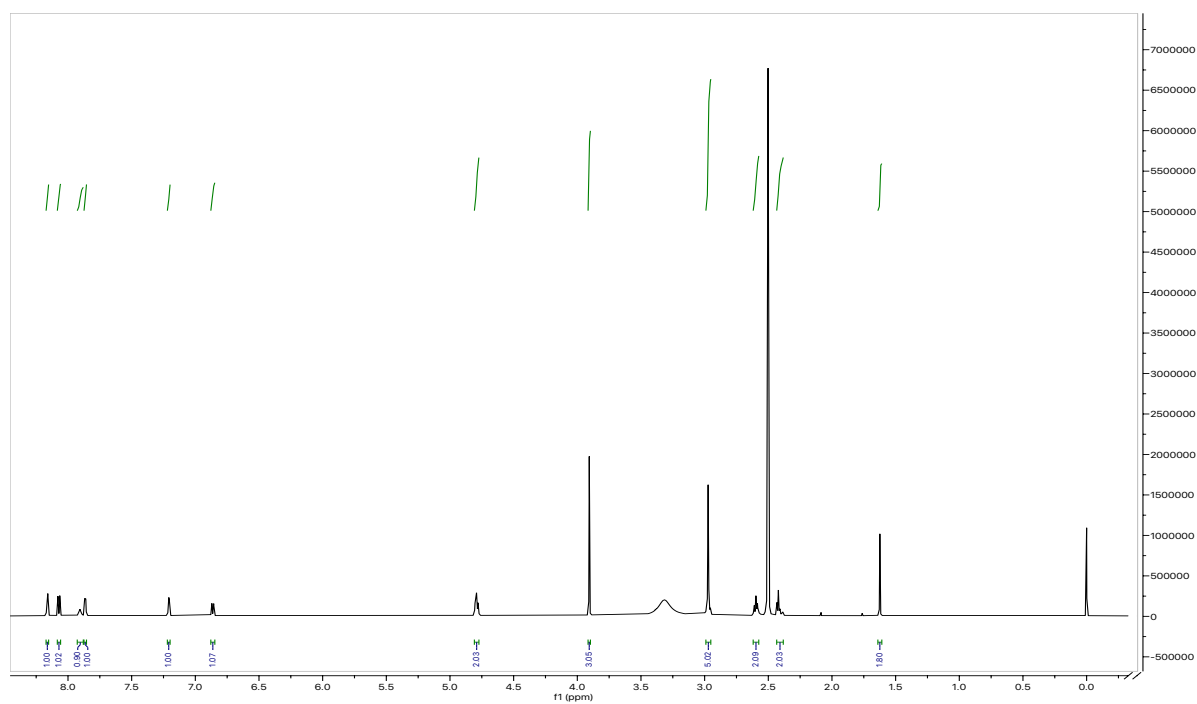
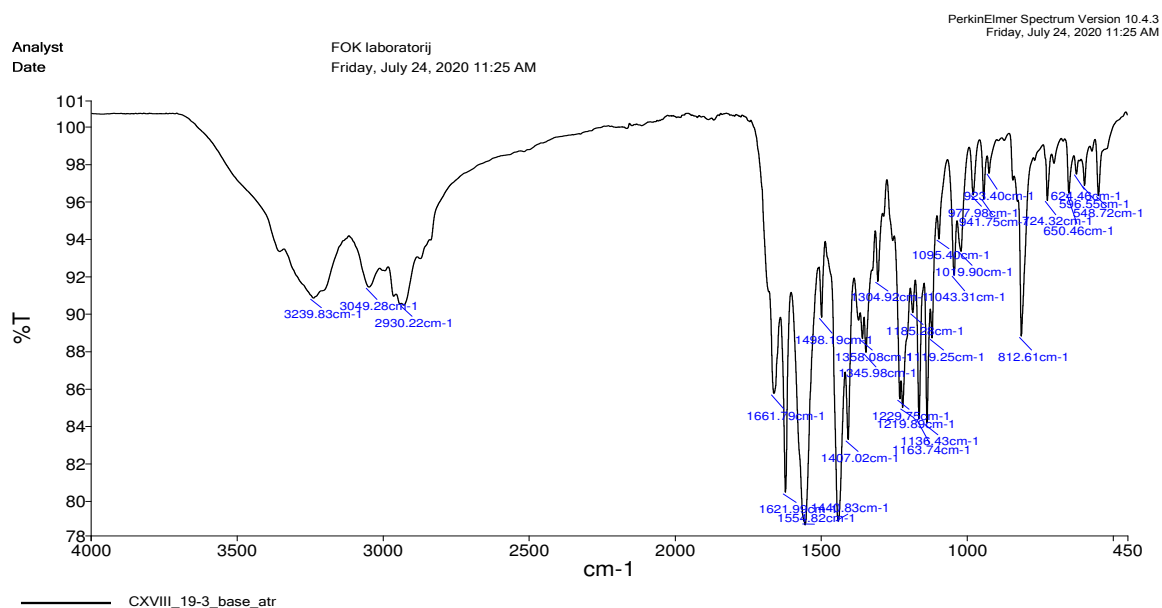
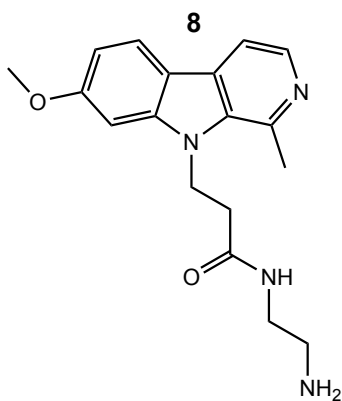












9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Derivati harmina kao potencijalni inhibitori bakterijskog biofilma

Katja Kapović

SAŽETAK

Biofilm je zajednica različitih vrsta mikroorganizama koji su uklopljeni u matriks. Matriks predstavlja fizičku barijeru koja otežava penetraciju antibiotika do ciljnih stanica, a s druge strane, zbog viskoelastičnosti otežano je mehaničko uklanjanje. Navedeno čini biofilm kako zdravstvenim, tako i industrijskim problemom s obzirom da se može formirati na bilo kojoj metalnoj ili plastičnoj površini. U ovom radu sintetizirana su tri potencijalna inhibitora biofilma (**6-8**). Sinteza se odvijala u četiri koraka, a kao početni spoj uzet je harmin. U prvom koraku sinteze Michaelovom adicijom dobiven je ester **1**. U idućem koraku u reakciji hidrolize dobivena je kiselina **2**. U trećem koraku sinteze reakcijom *couplinga* između kiseline **2** i odgovarajućeg amina (4-amino-1-Boc-piperidina, 4-(*N*-Boc-amino)piperidina ili *N*-Bocetilendiamina), uz HATU/DIEA dobiveni su *N*-Boc zaštićeni amidi (**3-5**). Boc zaštitna skupina uklonjena je u kiselim uvjetima, uz TFA, te su dobiveni odgovarajući amidi (**6-8**). Spojevima su određena su tališta, a njihove strukture potvrđene su standardnim spektroskopskim i spektrometrijskim tehnikama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS). U daljnjim istraživanjima, bit će ispitano njihovo inhibitorno djelovanje na bakterijski biofilm.

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

Rad sadrži: 63 stranice, 12 grafičkih prikaza, 7 tablica i 31 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Harmin, biofilm, *coupling*, sinteza.

Mentor: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ivana Perković, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ana Mornar Turk, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: listopad 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of medicinal chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Harmine derivatives as potential biofilm inhibitors

Katja Kapović

SUMMARY

Biofilm is a community consisting of various types of microorganisms embedded in extracellular matrix, which represents a physical barrier that complicates antibiotic penetration to target bacteria. Furthermore, mechanical removal is complicated due to viscoelastic properties of biofilm. Aforementioned makes biofilm a major healthcare, as well as industrial problem, due to the fact that it can be formed on any metal or plastic surface. Three potential biofilm inhibitors have been synthesized (**6-8**). Synthesis was done in a four step procedure using harmine as a starting compound. The first step included Michael reaction resulting in ester **1**, which was subsequently hydrolysed to give acid **2**. The third step included *coupling* reaction between acid **2** and corresponding amine (4-amino-1-Boc-piperidine, 4-(*N*-Boc-amino)piperidine or *N*-Boc-ethylenediamine), in the presence of HATU/DIEA, resulting in *N*-Boc protected amides (**3-5**). Boc protective group was removed under acid conditions, (TFA), to yield final compounds, amides (**6-8**). Melting points of new compounds were determined and their structures were confirmed using standard spectroscopic and spectrometric techniques (IR, ¹H and ¹³C NMR, MS). Their inhibitory activity on bacterial biofilm will be tested in further studies.

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

Thesis includes: 63 pages, 12 figures, 7 tables and 31 reference. Original is in Croatian language.

Keywords: harmine, biofilm, *coupling*, synthesis.

Mentor: **Zrinka Rajić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Zrinka Rajić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Perković, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: October 2020.