

# Antibakterijska aktivnost novosintetiziranih amidinobenzimidazolnih i kumarinskih spojeva

---

**Stojačić, Vlatka**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:838607>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Vlatka Stojčić**

**ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST  
NOVOSINTETIZIRANIH  
AMIDINOBENZIMIDAZOLNIH I  
KUMARINSKIH SPOJEVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Vlatka Stojčić**

**ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST  
NOVOSINTETIZIRANIH  
AMIDINOBENZIMIDAZOLNIH I  
KUMARINSKIH SPOJEVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku na Katedri za mikrobiologiju, parazitologiju i kliničko laboratorijsku dijagnostiku.

Mentor rada je izv. prof. dr. sc. Domagoj Drenjančević, dr. med. spec. med. mikrobiologije s parazitologijom.

Rad ima 33 radna lista, 2 tablice i 6 slika.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Domagoju Drenjančeviću na spremnosti da mi bude mentor, pruženom povjerenju, vodstvu, brojnim stručnim savjetima, nesebičnoj pomoći i podršci tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala dr. med. Marijanu Orloviću i lab. tech. Kristini Dominković na pozitivnoj, ugodnoj i kolegijalnoj atmosferi tijekom provođenja istraživanja. Uz dobru ekipu sve je lakše.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da budem dio projekta Hrvatske zaklade za znanost u svrhu izvođenja diplomskog rada.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, kojima sam neizmjereno zahvalna na pruženoj podršci, ohrabrenjima i ljubavi, jer bez njih sve što sam dosad postigla i postala ne bi bilo moguće.*

*Zahvaljujem dečku, na bezuvjetnoj podršci i strpljenju, kao i prijateljima koji su mi pružali razumijevanje i podršku i obogatili ovaj dio mog života.*

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Antibiotička rezistencija.....	1
1.2. Multirezistentne bakterije iz grupe ESKAPE .....	2
1.2.1. Acinetobacter baumannii .....	3
1.2.2. Escherichia coli.....	4
1.2.3. Staphylococcus aureus.....	4
1.3. Amidinobenzimidazoli.....	5
1.4. Kumarini .....	5
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	7
<b>3. MATERIJALI I METODE RADA</b> .....	8
3.1. Ustroj studije.....	8
3.2. Kultura mikroorganizama .....	8
3.3. Amidinobenzimidazolski i kumarinski spojevi.....	8
3.4. Priprema stock solucije i početne koncentracije antimikrobne tvari.....	9
3.5. Priprema inokuluma.....	9
3.6. Priprema Cation adjusted Müller – Hinton bujona i mikrotitarskih pločica – mikrodilucijska metoda .....	10
3.7. Očitavanje rezultata mikrodilucijskog testa.....	10
3.8. Kontrolni sojevi i antibiotici .....	16
3.9. Statističke metode .....	16
<b>4. REZULTATI</b> .....	18
<b>5. RASPRAVA</b> .....	22
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	26
<b>7. SAŽETAK</b> .....	28
<b>8. SUMMARY</b> .....	29
<b>9. LITERATURA</b> .....	30
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	33

## 1. UVOD

Otkrićem penicilina 1928. godine, britanski znanstvenik Alexander Fleming, pokrenuo je eru moderne medicine koja će dovesti do raširenog korištenja antibiotika u svrhe liječenja bakterijskih infekcija gram – pozitivnih i gram – negativnih uzročnika. No, tijekom godina pretjeranom uporabom antibiotika, bakterije su se svojim mehanizmima prilagođavale uvjetima okoliša. Tako su s vremenom i gram – pozitivne i gram – negativne bakterije razvile rezistenciju koja zajedno s rastućim mortalitetom i morbiditetom predstavlja problem globalnog zdravlja (1, 2).

### 1.1. Antibiotička rezistencija

Antibakterijski lijekovi selektivne toksičnosti nazivaju se antibioticima, odnosno tzv. antibakterijskim kemoterapeuticima, koji su primarno prirodno nastali kao produkti bakterija i gljiva koji se prije uporabe modificiraju u laboratorijima. Osim prirodnih, postoje i sintetički kemoterapeutici. Netoksični su za organizam čovjeka, ali su toksični za bakterije. Dva su djelovanja antibiotika: na zaustavljanje bakterijskog rasta i razmnožavanja, tzv. bakteriostatsko djelovanje, te na „ubijanje“ bakterija, tzv. baktericidno djelovanje. Razni su mehanizmi djelovanja antibiotika na biološke procese bakterijskih stanica: djelovanje na bakterijsku staničnu stijenku; a s obzirom da humane stanice ne sadrže peptidoglikan, postiže se velika selektivna toksičnost pa se govori o djelovanju na sintezu prekursora peptidoglikana ili formiranje peptidoglikanskog sloja; na sprječavanje sinteze proteina na ribosomima, sprječavanje sinteze nukleinskih kiselina i djelovanje na citoplazmatsku opnu ometajući njenu funkcionalnost (3). Antibiotička rezistencija može biti primarna (urođena, intrinzična) i sekundarna (stečena). Intrinzična rezistencija opisuje se kada bakterija nema ciljno mjesto djelovanja antibiotika, te ona određuje spektar djelovanja antibiotika prema kojem razlikujemo antibiotike širokog i uskog spektra. Stečena rezistencija posljedica je mehanizama: produkcije enzima koji modificiraju ili razgrađuju antibiotike; smanjene propusnosti stanične stijenke; promjene ciljnog mjesta djelovanja antibiotika; efluksa stanice te stvaranja biofilma. Antibiotičku rezistenciju karakterizira koncentracija antibiotika koja se

može postići u ljudskom organizmu, a da ne djeluje na bakteriju koja je prouzročila infekciju. Osjetljivost bakterije na antibiotik definirana je testom osjetljivosti ili antibiogramom, uz definiciju minimalne baktericidne koncentracije i minimalne (bakteriostatske) inhibitorne koncentracije. Osjetljivost je okarakterizirana djelovanjem antibiotika na bakterijski soj stvaranjem zone bez bakterijskog rasta uz prisutnost antibiotika (zona inhibicije). Poteškoće provođenja terapije, liječenja bakterijskih infekcija uzrokovanih multirezistentnim bakterijama i antibiotska rezistencija jedan je od najvažnijih mikrobioloških, epidemioloških i kliničkih problema suvremene medicine. Osobita važnost problema je u nozokomijalnim infekcijama koje su uzrokovane gram – pozitivnim i gram – negativnim bakterijama, vezana uz uporabu respiratora, kirurških instrumenata, katetera, ali i uz pretjerano prepisivanje i neodgovarajuću uporabu antibiotika (4, 5).

## 1.2. Multirezistentne bakterije iz grupe ESKAPE

Grupa ESKAPE obuhvaća *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* species, a sam naziv grupe akronim je imena ovih multirezistentnih gram – pozitivnih i gram – negativnih bakterija. ESKAPE patogeni vodeći su uzročnici nozokomijalnih infekcija u svijetu, koje najčešće uzrokuju po život opasne infekcije imunokompromitiranih pacijenata, a kao globalni prioritet investiranja za otkrivanje novih lijekova protiv ovih uzročnika uvrstila ih je i Svjetska zdravstvena organizacija (6). Novija terminologija uključuje *Clostridium difficile* te *Enterobacteriaceae* čime su obuhvaćene i *K. pneumoniae* i *Enterobacter* sp. sa završnim slovom „E“ u akronimu ESCAPE. Na taj način obuhvaćene su klostridijske infekcije koje su jedne od vodećih bolničkih infekcija, kao i infekcije uzrokovane enterobakterijama poput *E. coli* i *K. pneumoniae*. Koncept ESCAPE bakterija ukazuje pozornost na najproblematičnije bakterijske patogene (7). Nozokomijalne infekcije dijele se na endogene i egzogene infekcije koje mogu biti direktno ili indirektno prenesene kontaktom između zdravstvenih radnika, pacijenata, kontaminiranih površina ili objekata. ESBL producirajuće bakterije češće su problem nozokomijalnih uvjeta, ali i izvan nozokomijalnih uvjeta stvaraju probleme s antibiotskom rezistencijom i izborom odgovarajuće terapije u



liječenju infekcija. ESBL naziv stoji za *extended spectrum  $\beta$  – lactamase*, odnosno radi se o bakterijama koje uobičajene antibiotike poput penicilina i cefalosporina čine nedjelotvornima jer imaju mogućnost hidrolize antibiotika. U njih najčešće ubrajamo *S. aureus*, *Enterococci*, *Pseudomonas* spp. i *Enterobacteriaceae*. Također, aminoglikozidi i trimetoprim/sulfametoksazol rezistenciju su stekli plazmidima koji su sadržavali ESBL kodirajuće gene (8). Još jedan aktualni problem čini rezistencija na karbapeneme uslijed produkcije karbapenemaza, koja se također pojavljuje u nozokomijalnim infekcijama, posebice na odjelu intenzivne njege, pneumonija nastalih prilikom korištenja respiratora, infekcija rana, infekcija urinarnog trakta, kao npr. *Acinetobacter baumannii*, koji je jedan od najčešćih kliničkih izolata u takvim infekcijama (9).

### 1.2.1. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter* spp. pripada aerobnim gram – negativnim bakterijama, bakterijama koje su katalaza pozitivne, oksidaza negativne, nefermentativne, posjeduju kapsulu, ali ne posjeduju flagele, stoga su nepokretne. Čine dio sluznica i kože ljudi, a veliki postotak zdravih, nehospitaliziranih ljudi kolonizirano je ovim rodnom bakterijom i to u području gastrointestinalnog trakta. Patogenost *A. baumannii* osigurava mogućnost stvaranja biofilma i posjedovanje kapsule koja inhibira fagocitozu i adheriranje na sluznice, čime izbjegava obrambene, imunosne mehanizme organizma. Sadrži i lipopolisaharid te siderofore – acinetobaktin za akviziciju željeza. Dobro raste na većini uobičajenih agara poput krvnog agara ili MacConkeyeva agara pri 37 °C. Oportunistički patogen je jedan od čestih kliničkih izolata jer su čimbenici rizika prolongirana hospitalizacija, umjetna ventilacija, provođenje invazivnih procedura, kirurških operacija ili teške osnovne bolesti. Prirodno je rezistentna bakterija, koja lako stječe rezistenciju na antibiotike. Najčešće se rezistencija stvara na  $\beta$  – laktamske antibiotike, posebno u pojedinim skupinama kao što su karbapenemi (CRAB, carbapenem resistant *A. baumannii*) gdje se bakterijska stanična stijenka brani gubitkom proteina vanjske membrane i enzimima (3, 10).

### 1.2.2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* dio je normalne flore crijeva, kolonizira intestinalni sustav novorođenčeta prvih dana života, a pripada rodu *Escherichia*, koje imaju karakterističnu strukturu i fiziologiju za enterobakterije: gram – negativni štapići, metaboliziraju laktozu, a većina ih je pokretna, dok neki imaju fimbrije, a neki razvijenu kapsulu uslijed čega razlikujemo O - , K - i H – antigene. Lako se izolira na obogaćenim podlogama poput krvnog ili čokoladnog agara, a identifikacija se potvrđuje biokemijskim testovima. Postoji više patotipova *E. coli* prema kojima se razlikuju čimbenici virulencije i kliničke slike: enterotoksična (ETEC), enteropatogena (EPEC), K1 – pozitivna *E. coli*, uropatogena (UPEC) i druge. Brzo se razmnožava u hrani, osjetljiva je na dezinficijense, pa je prevencija prijenosa higijena ruku te u nozokomijalnim uvjetima pridržavanje načela asepsa i antiseptika u radu s pacijentima (3). Pripada grupi ESBL izolata kod kojih pronalazimo rezistenciju uslijed produkcije  $\beta$  – laktamaza proširenog spektra, ali posljednjih godina čest su pronalazak i sojevi koji produciraju karbapenemaze, a čest je uzročnik infekcija urinarnog trakta te bakterijemija, posebno u nozokomijalnim uvjetima, ali u palijativnim ustanovama i rehabilitacijskim centrima (11).

### 1.2.3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* jedan je od najčešćih humanih patogena, ali i dio normalne flore vestibula nosa, vlažnih dijelova kože i intestinalnog sustava u nekih ljudi. Ovi gram – pozitivni koki u skupinama sadrže polisaharidnu kapsulu, a staničnu stijenku grade teikoična kiselina (antigenski specifična za *S. aureus*), te lanci N – acetilmuramične kiseline i N – acetilglikozamina umreženih pentaglicinskim mostovima. Na površini stijenke je površinski protein A koji se veže na Fc – fragment IgG i tako postaje neprepoznatljiv humanom obrambenom sustavu. Osjetljiv je na dezinficijense te na povišenu temperaturu, ali dobro raste uz visoke koncentracije soli i šećera. Može se uzgojiti pri aerobnim uvjetima na krvnom agaru. Poseban problem čini meticilin – rezistentan *S. aureus* (MRSA) čiji sojevi nose transmisivne i raznolike genetičke elemente upakirane u stafilokoknu kromosomsku kazetu

mec (SCCmec) od koje su nam poznata tri tipa, a dva su poznata kao humana izolata, mecA i mecC. Također ovo može biti korišteno i u razlikovanju MRSA izvanbolničkih i bolničkih sojeva, pa prema tome tipovi bolničkih najčešće su I, II i III, dok su izvanbolnički tipovi IV – VIII. Vodeći je uzročnik hospitalnih infekcija i povećanog mortaliteta. Za dijagnostiku MRSA koristimo PCR (lančanu reakciju polimeraze) kojom se otkriva prisutnost mecA gena i gena koji identificiraju *S. aureus* (3, 12, 13).

### 1.3. Amidinobenzimidazoli

Strukturalne izostere purinskih baza čine benzimidazolni derivati s heterocikličkom jezgrom, što im omogućava interakciju s biopolimerima – daje im širok raspon bioloških i kliničkih primjena: antitumorskih, antimikrobnih, antituberkulostatskih, antidijabetskih, antioksidativnih i još mnogih drugih. Posljednjih godina, veliki broj istraživanja usmjeren je upravo na nove antibakterijske agense bazirane na benzimidazolima, što je otkrilo značajan unos DNA liganda koji sadrže amidine u bakterije, sposobnost imitacije različitih funkcionalnih grupa (npr. C – 4 atom ponaša se kao elektrofil, dok na petom mjestu molekule imamo CH vezu koja se ponaša kao donor vodika, a N – 3 parovi elektrona postaju akceptori vodika). Farmakološka svojstva benzimidazola koji sadrže azolne prstenove opisujemo stvaranjem nekovalentnih interakcija s brojnim ciljnim mjestima, zahvaljujući aromatskim svojstvima bogatim elektronima i heteroatomima. Brojna istraživanja pokazuju da su neki od tih spojeva pokazali učinkovito djelovanje za *Helicobacter pylori*, *Moraxella catarrhalis*, inhibiciju rasta gram – pozitivnih bakterija, uključujući i dva soja MRSA, a bis – benzimidazol (ridinilazol) nalazi se u trećoj fazi humanih kliničkih istraživanja za *Clostridium difficile* (14, 15, 16).

### 1.4. Kumarini

Heterociklički spojevi, kumarini, u svojoj strukturi heteroatoma sadrže atome kisika. Derivati kumarina nalaze se u biljnim vrstama (npr. voću) i produktima metabolizma

mikroorganizama. Osim u industriji parfema i prehrambenoj industriji, ovi spojevi korisni su u medicinskoj primjeni – kao antikoagulansi, dikumaroli, nastali zagrijavanjem kumarina, a jedan od najpoznatijih je varfarin; djelovanjem na biosintezu vitamina K; antifugalnim djelovanjem (umbeliferon); vaskularnim terapijskim djelovanjem (eskulin), kao i skopoletin koji regulira krvni tlak, djeluje antibakterijski i regulira razinu serotonina. Ostala djelovanja su: antihelmentičko, sedativno, hipnotičko, estrogeno, antikancerogeno, a derivati koji se ističu su aflatoksini, heterociklički spojevi s kumarinskom jezgrom, koji su produkti rodova plijesni poput *Aspergillus niger*. Dokazana je i inhibicija proliferacije staničnih linija dobivenih *in vitro* iz ljudskog organizma, a prema nekim istraživanjima pokazalo se da dodatak kateholne skupine povećava citotoksičnu aktivnost na stanice tumora. U jednom istraživanju postignuta je inhibicija rasta sojeva *S. aureus* i MRSA pri MIK 8 – 16 µg/mL derivatom kumarina, biskumarinom, nazvanim 3,3'-(2-tienil-metilen)-bis-(4-hidroksikumarin), a provedena su i istraživanja s dodatkom kumarina antibiotiku kako bi se dokazala povećana aktivnost ili izostanak aktivnosti te se pokazalo da ukoliko tetraciklinu dodamo derivate 4 – hidroksi-, 6 – hidroksi- i 7 – hidroksikumarina koji su sintetizirani iz ovih komercijalnih kumarina alkilacijom, acetilacijom i nitracijom, može se upola smanjiti minimalna inhibitorna koncentracija (bez dodatka kumarina rezultat je 64 µg/mL, dok uz dodatak derivata MIK iznosi 32 µg/mL), a na primjeru norfloksacina dokazano je i višestruko poboljšanje, odnosno MIK norfloksacina iznosi 128 µg/mL, dok uz korištene derivate iznosi od 16 do 64 µg/mL, ovisno o derivatu (17, 18, 19).

## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovoga istraživanja su:

1. Testirati osjetljivost bakterija na novosintetizirane amidinobenzimidazolne i kumarinske spojeve mikrodilucijskom metodom;
2. Interpretirati rezultate osjetljivosti;
3. Usporediti osjetljivost između bakterijskih vrsta.

### 3. MATERIJALI I METODE RADA

#### 3.1. Ustroj studije

Ova studija je temeljno fundamentalno *in vitro* istraživanje.

#### 3.2. Kultura mikroorganizama

Istraživanje je provedeno na tri ATCC (American Type Culture Collection; referentni mikrobnj sojevi) soja bakterija: *Acinetobacter baumannii* ATCC (19606), *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) i *Escherichia coli* ATCC (25922), te na tri bakterijska soja kliničkih izolata: *Acinetobacter baumannii* (9768), meticilin – rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) ESBL (11710) i *Escherichia coli* ESBL (26001) iz zbirke bakterijskih sojeva Katedre za mikrobiologiju, parazitologiju i kliničko laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Istraživanje je obavljeno u laboratoriju Katedre za mikrobiologiju, parazitologiju i kliničko laboratorijsku dijagnostiku na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

#### 3.3. Amidinobenzimidazolni i kumarinski spojevi

Aminidinobenzimidazolni i kumarinski de novo sintetizirani spojevi korišteni u ovom istraživanju dio su projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) pod nazivom: „Novi spojevi temeljeni na bioizosterima purina za ispitivanje njihovih antitumorskih i antipatogenih djelovanja“, (PurBioCaPa), šifra projekta: 4682, voditelj projekta: prof. dr. sc. Silvana Raić Malić, Hrvatska zaklada za znanost; te kao takvi su šifrirani i zaštićeni podatci.

### 3.4. Priprema stock solucije i početne koncentracije antimikrobne tvari

Ispitivanu tvar otopiti u DMSO (dimetil – sulfoksidu) u izračunatom volumenu prema zadanoj formuli:

$$\text{volumen (mL)} = \frac{\text{masa (mg)} * \text{potencijal } (\mu\text{g/mg})}{\text{koncentracija } (\mu\text{g/mL})}$$

Ukoliko je tvar teže topljiva u dimetil – sulfoksidu, te talog preostaje i nakon vorteksiranja kivete u kojoj se tvar otapala, koristi se ultrazvučna kupelj sa sterilnom vodom. Neke tvari potrebno je i nakon otapanja dodatno vorteksirati uslijed sedimentacije. Nakon što je tvar otopljena, 50  $\mu\text{L}$  stock solucije dodaje se u 4950  $\mu\text{L}$  CAMH (Cation adjusted Müller – Hinton) bujona te se dobije početna koncentracija spojeva od 128  $\mu\text{L/mL}$ .

Jednako se pripremaju antibiotici za kontrolu, 250  $\mu\text{L}$  antibiotika i 4750  $\mu\text{L}$  CAMH bujona.

### 3.5. Priprema inokuluma

Nakon prekonoćne inkubacije sojeva bakterija na 37 °C tijekom 16 do 20 sati u inkubatoru u ambijentalnim uvjetima na krvnom agaru (neselektivnoj podlozi), potrebno je pripremiti suspenziju ispitivanog soja od 0,5 McFarlanda u 4 – 5 mL fiziološke otopine.

Potrebno je postići koncentraciju 1 – 2x10<sup>8</sup> CFU/mL koja će dodavanjem u 5 mL CAMH bujona rezultirati s 1 – 2x10<sup>6</sup> CFU/mL: pipetira se 50  $\mu\text{L}$  pripremljenog inokuluma u 5 mL CAMH bujona. Sve je potrebno homogenizirati vorteksiranjem. Pripremljeni inokulum provjerava se na densitometru (OD = optical density, engl. optička gustoća). Pripremljenu suspenziju bakterija potrebno je pipetirati u jažice unutar 15 – 30 minuta od pripreme u volumenu od 50  $\mu\text{L}$ .

### 3.6. Priprema Cation adjusted Müller – Hinton bujona i mikrotitarskih pločica – mikrodilucijska metoda

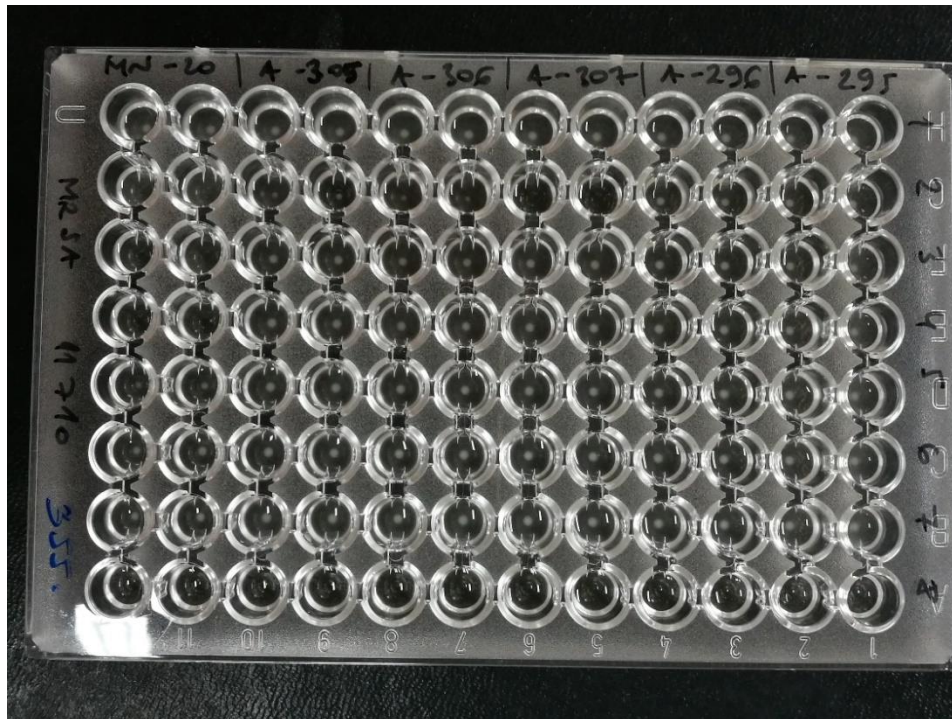
Svaku sterilnu mikrotitarsku pločicu označi se nazivima bakterijskih sojeva koji su korišteni u istraživanju: *Acinetobacter baumannii* (9768), meticilin – rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) ESBL (11710), *Escherichia coli* ESBL (26001), *Acinetobacter baumannii* ATCC (19606), *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) i *Escherichia coli* ATCC (25922). Potom se steriliziraju pod UV lampom 10 minuta. 50  $\mu\text{L}$  Müller – Hinton Cation Adjusted bujona (CAMH) pipetira se u sve jažice osim druge jažice po redu jer se u tu jažicu pipetira 100  $\mu\text{L}$  otopljene tvari. Od iste te druge jažice započinje dvostruko razrijeđivanje tvari automatskom multikanalnom CAPP pipetom iz sterilne Petrijeve zdjelice (serijsko razrijeđenje tvari – iz druge jažice pipetom se uzima 50  $\mu\text{L}$  otopljene tvari i prebaci u sljedeću, 2 – 3 puta promiješa i postupak se ponavlja do posljednje jažice u koju se dekantira zadnjih 50  $\mu\text{L}$  (razrijeđenja jažica kreću se od 128  $\mu\text{L}/\text{mL}$  pa se serijski smanjuju po jažicama – 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )). Bitno je primijeniti princip po kojem se u prvu jažicu nikad ne dodaje spoj, a u zadnju se ne dodaje bakterijski soj – ukoliko se poprati protokol, spoj se dodaje od druge jažice i razrijeđuje, te je zato u zadnjoj jažici konačni ukupni volumen od 100  $\mu\text{L}$  koji se u prethodnim jažicama postiže dodavanjem bakterijskog soja.

Nakon dodanih tvari i inokuluma, mikrotitarske pločice se prekonoćno inkubiraju pri 37 °C u ambijentalnim uvjetima. Nakon inkubacije, očitavaju se rezultati.

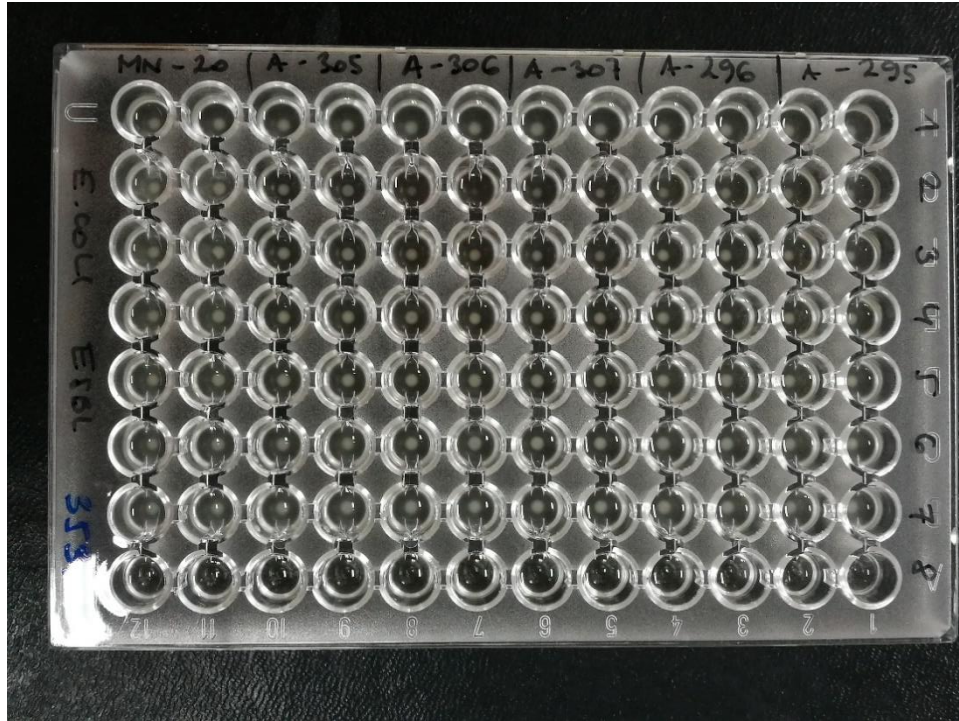
### 3.7. Očitavanje rezultata mikrodilucijskog testa

Minimalna inhibitorna koncentracija je koncentracija pri kojoj antimikrobna tvar u potpunosti inhibira rast mikroorganizma. Rezultate se očitava vizualno – prvo je potrebno provjeriti jesu li kontrole spoja i kontrole rasta soja (koje se nalaze u prvoj i zadnjoj jažici) validne, odnosno da nije došlo do kontaminacije. Da bi test bio validan, prihvatljiv je rast  $\geq 2$  mm „gumbića“ ili zamućenost kontrolne jažice rasta soja. Ukoliko uvjeti jesu zadovoljeni, mikrotitarska pločica može se očitati. Usporedbom kontrolnih i testiranih jažica, očitava se minimalna inhibitorna koncentracija.





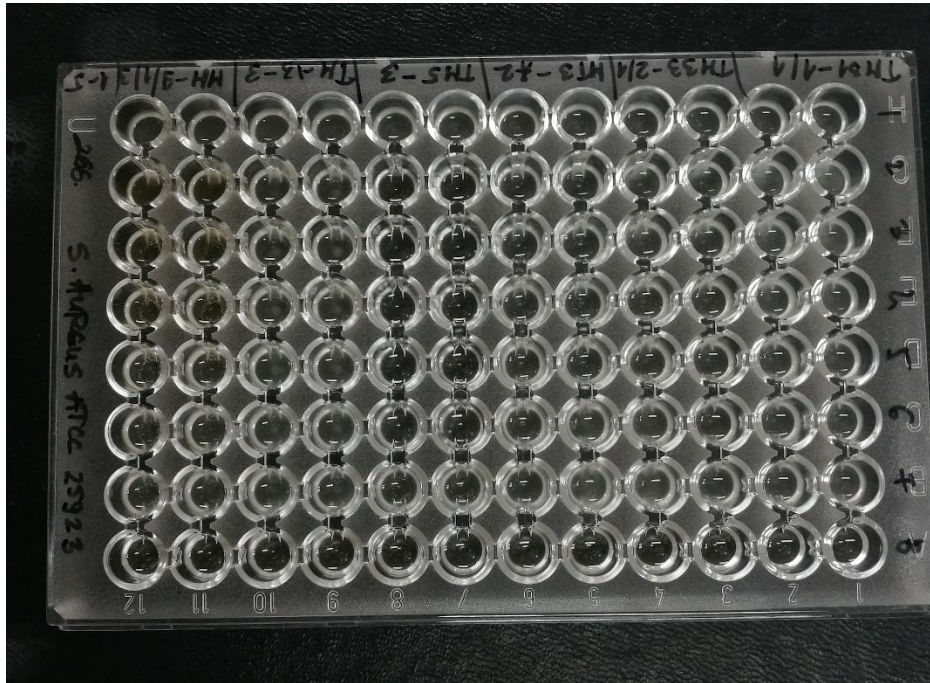
Slika 1. Porast bakterijskih kolonija očitovan kao pojava „gumbića“ na dnu mikrotitarske pločice meticilin – rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) ESBL (11710) (fotografirala Vlatka Stojčić, Medicinski fakultet Osijek)



Slika 2. Porast bakterijskih kolonija očitovan kao pojava „gumbića“ na dnu mikrotitarske pločice *Escherichia coli* ESBL (26001) (fotografirala Vlatka Stojčić, Medicinski fakultet Osijek)

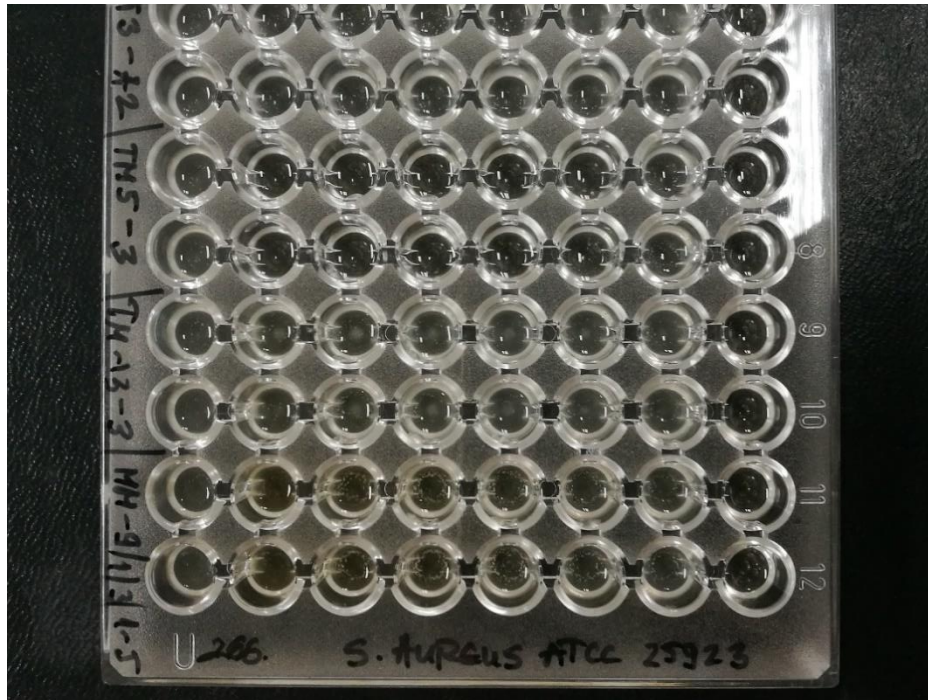


Slika 3. Prikaz minimalne inhibitorne koncentracije kumarinskog spoja TM5 – 3 pri 16  $\mu\text{g/mL}$  na mikrotitarskoj pločici *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), donji prikaz (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)



Slika 4. Prikaz minimalne inhibitorne koncentracije kumarinskog spoja TM5 – 3 pri 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  na mikrotitarskoj pločici *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), gornji prikaz (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)

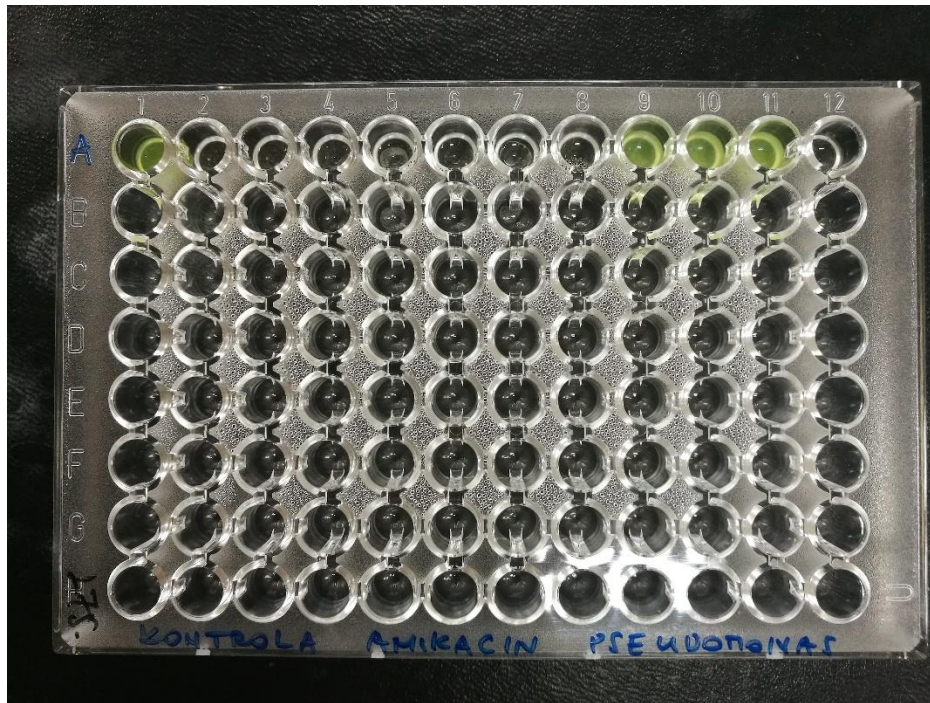




Slika 5. Prikaz minimalne inhibitorne koncentracije kumarinskog spoja TM5 – 3 pri 16 µg/mL na mikrotitarskoj pločici *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), približeni prikaz (fotografirala Vlatka Stojčić, Medicinski fakultet Osijek)

## 3.8. Kontrolni sojevi i antibiotici

Kao kontrolni sojevi i antibiotici korišteni su *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) i amikacin.



Slika 6. Mikrotitarska kontrolna pločica s amikacinom i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) pri MIK 2  $\mu\text{g/mL}$  (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)

## 3.9. Statističke metode

Podatci definirani ciljevima istraživanja kao i rezultati provedenog ispitivanja bit će prikazani grafički i tabelarno te obrađeni deskriptivnom statistikom. Kategorijski podatci bit će predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama, a numerički podatci bit će opisani

aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjele koja slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama intrakvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli bit će testirane hi – kvadrat testom ili Fischerovim egzaktnim testom. Razlike numeričkih varijabli između dvije nezavisne skupine bit će testirane Student-t testom ili Mann Whitneyevim U testom u ovisnosti o normalnosti raspodjele varijabli. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti bit će podešena na  $\alpha = 0,05$ . Podatci će biti statistički analizirani upotrebom informatičkog programa SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD) i Microsoft Office Excel tabličnog kalkulatora.

## 4. REZULTATI

Istraživanje je napravljeno na ukupno 58 spojeva, 29 izabranih amidinobenzimidazolnih spojeva i 29 izabranih kumarinskih spojeva te na tri ATCC soja bakterija: *Acinetobacter baumannii* ATCC (19606), *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) i *Escherichia coli* ATCC (25922) te na tri bakterijska soja kliničkih izolata: *Acinetobacter baumannii* (9768), meticilin – rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) ESBL (11710) i *Escherichia coli* ESBL (26001).

Detekcijom minimalne inhibitorne koncentracije spoja, rezultate se očitava vizualno – usporedbom kontrolnih i testiranih jažica mikrotitarskih pločica, uz zadovoljene uvjete validnosti rasta  $\geq 2$  mm „gumbića“ ili zamućenošću kontrolne jažice rasta soja.

### **Gram – pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* ATCC (25923), meticilin – rezistentan *S. aureus* MRSA (11710))**

Od ukupno 29 (100 %) spojeva amidinobenzimidazola testiranih na *S. aureus* ATCC (25923), 21 (72 %) spoj nije imao inhibitorni učinak, odnosno minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) iznosila je  $> 128$   $\mu\text{g/mL}$ . Kod ostalih 8 (28 %) spojeva opaženo je inhibitorno djelovanje pri različitim koncentracijama: MIK 8  $\mu\text{g/mL}$  imala su 2 (7 %) spoja, MIK 16  $\mu\text{g/mL}$  2 (7 %) spoja, MIK 32  $\mu\text{g/mL}$  1 (3 %) spoj i MIK 128  $\mu\text{g/mL}$  3 (10 %) spoja. Kod kumarinskih spojeva testiranih na *S. aureus* ATCC (25923), 28 (97 %) spojeva nije imalo inhibitornog učinka, dok se kod 1 (3 %) spoja mogla očitati MIK 16  $\mu\text{g/mL}$  (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,06$ ) (Tablica 1).

Jednak broj amidinobenzimidazolnih i kumarinskih spojeva testiran je i na meticilin – rezistentan *S. aureus* MRSA (11710) te su rezultati sljedeći: od ukupnih 29 (100 %) amidinobenzimidazolnih spojeva, 18 (62 %) spojeva nije imalo inhibitorno djelovanje (MIK  $> 128$   $\mu\text{g/mL}$ ), MIK 2  $\mu\text{g/mL}$  očitana je kod 1 (3 %) spoja, kao i MIK 8  $\mu\text{g/mL}$  kod 1 (3 %)



spoja, potom 3 (10 %) spoja MIK 32 µg/mL, 3 spoja (10 %) MIK 64 µg/mL i 3 (10 %) MIK 128 µg/mL. MIK 25 (86 %) kumarinskih spojeva iznosi > 128 µg/mL, kod 3 (10 %) spoja MIK iznosi 128 µg/mL i kod 1 (3 %) spoja iznosi 16 µg/mL (Fisherov egzaktni test, P = 0,06) (Tablica 1).

Tablica 1. Raspodjela prema vrstama bakterija i vrstama spojeva (gram – pozitivne bakterije)

	Broj (%) uzoraka			P*
	Amidinobenzimidazoli	Kumarini	Ukupno	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (25923)				
8	2 (7)	0	2 (3)	0,06
16	2 (7)	1 (3)	3 (5)	
32	1 (3)	0	1 (2)	
128	3 (10)	0	3 (5)	
> 128	21 (72)	28 (97)	49 (84)	
<i>Meticilin – rezistentan S. aureus</i> MRSA (11710)				
2	1 (3)	0	1 (2)	0,06
8	1 (3)	0	1 (2)	
16	0	1 (3)	1 (2)	
32	3 (10)	0	3 (5)	
64	3 (10)	0	3 (5)	
128	3 (10)	3 (10)	6 (10)	
> 128	18 (62)	25 (86)	43 (74)	
	29 (100)	29 (100)	58 (100)	

\*Fisherov egzaktni test

**Gram – negativne bakterije (*Escherichia coli* ATCC (25922), *Acinetobacter baumannii* ATCC (19606), *Acinetobacter baumannii* (9768), *Escherichia coli* ESBL (26001))**

Kod 25 (86 %) amidinobenzimidazolnih spojeva testiranih na *Escherichia coli* ATCC (25922) očitana je MIK > 128 µg/mL, kod 1 (3 %) spoja MIK 128 µg/mL te kod 3 (10 %)

spoja MIK 64 µg/mL. Kod 29 (100 %) kumarinskih spojeva testiranih na istoj vrsti bakterije, MIK spojeva su iznosile > 128 µg/mL (Fisher egzaktni test, P = 0,11) (Tablica 2).

MIK iznosila je > 128 µg/mL kod 28 (97 %) amidinobenzimidazolnih spojeva ispitanih na *Acinetobacter baumannii* ATCC (19606), dok je kod 1 (3 %) spoja MIK 128 µg/mL. Na istoj vrsti bakterije testirano je i 29 (100 %) kumarinskih spojeva na kojima je očitana MIK > 128 µg/mL (Fisherov egzaktni test, P = 0,99) (Tablica 2).

Jednaki rezultati kao kod *Acinetobacter baumannii* ATCC (19606), očitani su i kod *Acinetobacter baumannii* (9768): MIK > 128 µg/mL kod 28 (97 %) amidinobenzimidazolnih spojeva te MIK 128 µg/mL kod 1 (3 %) spoja te MIK > 128 µg/mL kod 29 (100 %) kumarinskih spojeva (Fisherov egzaktni test, P = 0,99) (Tablica 2).

Testiranjem *Escherichia coli* ESBL (26001) na amidinobenzimidazolne spojeve, dobiveni su sljedeći rezultati: kod 18 (62 %) spojeva je MIK > 128 µg/mL, kod 7 (24 %) spojeva MIK iznosi 128 µg/mL, kod 2 (7 %) spoja MIK iznosi 64 µg/mL te kod 2 (7 %) spoja MIK iznosi 32 µg/mL. Kod svih 29 (100 %) kumarinskih spojeva testiranih na istu vrstu bakterije, nije opaženo inhibitorno djelovanje, odnosno MIK > 128 µg/mL (Fisherov egzaktni test, P < 0,001) (Tablica 2).

Tablica 2. Raspodjela prema vrsti bakterija i vrstama spojeva (gram – negativne bakterije)

	Broj (%) uzoraka			P*
	Amidinobenzimidazoli	Kumarini	Ukupno	
<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)				
64	3 (10)	0	3 (5)	0,11
128	1 (3)	0	1 (2)	
> 128	25 (86)	29 (100)	54 (93)	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC (19606)				
128	1 (3)	0	1 (2)	> 0,99
> 128	28 (97)	29 (100)	57 (98)	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (9768)				
128	1 (3)	0	1 (2)	> 0,99
> 128	28 (97)	29 (100)	57 (98)	
<i>Escherichia coli</i> ESBL (26001)				
32	2 (7)	0	2 (3)	< 0,001
64	2 (7)	0	2 (3)	
128	7 (24)	0	7 (12)	
> 128	18 (62)	29 (100)	47 (81)	
	29 (100)	29 (100)	58 (100)	

\*Fisherov egzaktni test

## 5. RASPRAVA

Interpretacijom dobivenih rezultata dolazimo do spoznaje da su amidinobenzimidazolni spojevi pokazali bolju inhibitornu aktivnost, odnosno širok raspon minimalnih inhibitornih koncentracija protiv gram – pozitivnih i gram – negativnih bakterija spram kumarinskih spojeva.

Ovo istraživanje možemo usporediti s istraživanjem provedenim na također de novo sintetiziranim tvarima koje u svojoj kemijskoj strukturi sadrže benzimidazole, gdje je pet od pedeset i tri spojeva pokazalo značajniju inhibitornu aktivnost, odnosno minimalne inhibitorne koncentracije testiranih spojeva na gram – pozitivne sojeve iznosile su 32 – 64 µg/mL, od kojih su dva spoja imala minimalne inhibitorne koncentracije usporedive s djelovanjem ciprofloksacina na dva soja meticilin – rezistentnog *S. aureus* (MRSA) (20). Nadalje, u jednom od istraživanja novosintetiziranih benzimidazolnih derivata na sojevima *E. coli* uzorkovanim na pacijentima oboljelim od urinarnih infekcija, pokazano je da su izolati osjetljivi na djelovanje benzimidazole (21).

Još jedno istraživanje na derivatima benzimidazola u usporedbi s različitim kombinacijama antibiotika na ESKAPE skupini patogena, koje su korištene i u ovom istraživanju, kao bakterije od interesa, pokazalo je da derivati imaju mogućnost interakcije s vanjskom membranom gram – negativnih bakterija uz sinergiju derivata i antibiotika koji su već u uporabi (22). Također, jedno od istraživanja učinkovitosti derivata benzimidazola napravljeno je na *S. aureus*, više sojeva *E. coli* i drugim bakterijama, no rezultati su pokazali da većina tvari nije djelovala, osim jedne tvari koja je pokazivala snažnu aktivnost protiv četiri različita serotipa *E. coli*, pri MIK 0,49 µg/mL. Sojevi su bili dio intestinalne flore, pa bi ovakav rezultat ukazivao na novu mogućnost izbora intestinalnog antiseptika. Osim toga, antimikrobni spektar nifuroksazida (antidijaroični lijek koji djeluje na gram – pozitivne koke poput *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus pyogenes* te na gram – negativne bakterije poput *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*) podržava prethodno navedenu tvrdnju, s obzirom da je

minimalna inhibitorna koncentracija testirane tvari bila niža od antibiotika (0,49 µg/mL spram 31,25 µg/mL), a nadovezuje se i na nekoliko rezultata dobivenih u ovom istraživanju u kojem i na ESBL soju *E. coli* i *E. coli* ATCC rezultate pronalazimo u rasponu od 32 do 64 µg/mL (23).

Testiranjem *in vitro* antibakterijske aktivnost 5 – amidinobenzimidazola na gram – pozitivne bakterije *S. aureus* ATCC (25923), *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) i na gram – negativne bakterije uključujući *E. coli* ATCC (25925), *K. pneumoniae* (ATCC 700803), *P. aeruginosa* ATCC (27853) i *Acinetobacter baumannii* ATCC (19606) detektirane su minimalne inhibitorne koncentracije koje su se potom uspoređivale s aktivnošću ceftazidima, ciproflaksacina, ampicilina i gentamicina. U ovom istraživanju, testirani spojevi pokazali su bolju antibakterijsku aktivnost na gram – pozitivnim bakterijama, što se može usporediti s ovim istraživanjem, u kojem je raspon MIK koje su pokazale inhibitorno djelovanje obuhvaćen koncentracijama od 2 µg/mL do 128 µg/mL, dok su rezultati gram – negativnih bakterija u rasponu 32 – 128 µg/mL. Od rezultata, potrebno je spomenuti učinkovitu antibakterijsku aktivnost derivata 5 – amidinobenzimidazola na tri gram – negativna soja bakterija (*E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* ESBL i *P. aeruginosa* ESBL), od kojih se jedan od derivata, 5 – amidinobenzimidazol s N-1-fenil-1,2,3-triazolom pokazao najpotentnijim s inhibiranim rastom pri koncentraciji od 4 µg/mL na *E. coli* i 8 µg/mL na *K. pneumoniae*; širok raspon minimalnih inhibitornih koncentracija na MRSA s 5-N-izopropilamidinobenzimidazolnim derivatima koje su iznosile 8 – 32 µg/mL, a na MSSA je MIK bila u rasponu 16 – 128 µg/mL; potencijalno obećavajuću aktivnost na MRSA soj (MIK = 8µg/mL). Ovim istraživanjem pokazan je potencijal amidinobenzimidazolnih derivata na gram – pozitivne bakterije (MRSA) te ESBL producirajuće *E. coli* sojeve u usporedbi s referentnim antibioticima od kojih su većina tih bakterija testirane i u ovom istraživanju (16).

Antibakterijska aktivnost kumarina jedno je od aktualnih istraživanja kao de novo sintetiziranih derivata, s obzirom da prirodni kumarini, odnosno njihova jednostavna struktura ima nisku antibakterijsku aktivnost, a uz biotehnološku intervenciju mogu se stvoriti potentniji derivati. Jedno od takvih istraživanja ukazuje da su neki od derivata

kumarina korišteni u testiranju na gram – pozitivne bakterije, poput MSSA, pokazali niske minimalne inhibitorne koncentracije (3,125  $\mu\text{g/mL}$ ). Također, tri od četiri testirana MRSA soja sa SCC mec II ili III genskim otocima koji su sadržavali multiplu rezistenciju, inhibirani su istim derivatom i najniža minimalna inhibitorna koncentracija iznosila je 1,56  $\mu\text{g/mL}$ . Osim na gram – pozitivnim bakterijama, gram – negativne bakterije poput *A. baumannii* testirane su na dva derivata kumarina i inhibiran im je rast pri MIK 6,25  $\mu\text{g/mL}$ . (24) Nadalje, u jednom istraživanju, nosintetizirani kumarinski derivat, razmatran je kao potencijalni inhibitor MRSA i formacije biofilma te je istraživanje pokazalo da derivati biskumarina pokazuju aktivnost protiv više sojeva *S. aureus* (klinički i ATCC MRSA) u rasponu MIK 4 – 32  $\mu\text{g/mL}$ , ali da ne pokazuju aktivnost na gram – negativnim bakterijama poput *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* i *A. baumannii*, kod kojih je MIK iznosio > 256  $\mu\text{g/mL}$ . Također, dokazana je inhibicija formacije biofilma na fluorescentnom mikroskopu (25). Stoga, iako se u ovom istraživanju od 29 kumarinskih derivata nijedan nije pokazao djelotvornim na testirane gram – negativne bakterije, s obzirom na rezultate gram – pozitivnih bakterija *S. aureus* (MIK = 16  $\mu\text{g/mL}$ ) i MRSA (MIK = 16  $\mu\text{g/mL}$  i MIK = 128  $\mu\text{g/mL}$ ), vidljiv je obećavajući potencijal kumarinskih derivata u budućim istraživanjima.

Budućnost istraživanja amidinobenzimidazolnih i kumarinskih derivata osigurana je sveprisutnijom i rapidno rastućom antibiotskom rezistencijom. Rješavanju ovoga problema doprinosi sintetiziranje novih spojeva čiju se antibakterijsku aktivnost može testirati na različitim metodama (mikrodilucijskom metodom, određivanjem vijabilnosti bakterija, određivanjem sinergističkog djelovanja s konvencionalnim antibioticima) (26). Važnost razvoja novih antiinfektivnih tvari je u realnoj mogućnosti kliničke uporabe, što im omogućuju kemijske modifikacije i aplikacije na tvarima koje bi tako imale poboljšanu bioaktivnost. Osim antibakterijskog inhibitornog djelovanja, ove dvije skupine spojeva predmet su istraživanja i antiparazitskog djelovanja, kao npr. u tripanosomskim infekcijama.

Može se zaključiti da su rezultati ovog istraživanja pokazali obećavajuće kandidate za daljnji optimizam i razvoj novih i djelotvornijih tvari, posebno u skupini amidinobenzimidazolnih derivata, a u skupini kumarina usmjerili su na daljnje testiranje i potragu za odgovarajućom

koncentracijom i bakterijom na koje će djelovati s obzirom na sve veći broj rezistentnih bakterija.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, u nastavku slijede zaključci.

- Testiranjem spojeva amidinobenzimidazola na *S. aureus* ATCC (25923) pokazana je antibakterijska aktivnost u rasponu 8 – 128 µg/mL, što obuhvaća 8 (28 %) amidinobenzimidazolnih tvari, a 21 (72 %) tvar nije pokazala antibakterijsku aktivnost (MIK > 128 µg/mL). 1 (3 %) kumarinski spoj pokazao se osjetljivim, dok je ostalih 28 (97 %) spojeva imalo MIK > 128 µg/mL.
- 11 (38 %) amidinobenzimidazolnih spojeva pokazali su se osjetljivima u rasponu minimalnih inhibitornih koncentracija 2 – 128 µg/mL kod meticilin – rezistentnog *S. aureus* (MRSA) (11710), a 18 (62 %) spojeva nije pokazalo antibakterijsku aktivnost, MIK > 128 µg/mL. Kod kumarinskih spojeva, 1 (3 %) spoj pokazao je MIK 16 µg/mL, 3 (10 %) spoja 128 µg/mL, dok je kod ostalih 25 (86 %) spojeva MIK > 128 µg/mL.
- Testiranjem kumarinskih spojeva na *E. coli* ATCC (25922), *A. baumannii* ATCC (19606), *A. baumannii* (9768) i *E. coli* ESBL (26001) nije pokazana značajna antibakterijska aktivnost, MIK > 128 µg/mL kod svih 29 (100 %) kumarinskih spojeva.
- Kod 3 (10 %) amidinobenzimidazolnih spojeva testiranih na *E. coli* ATCC (25922), očitana je MIK 64 µg/mL, kod 1 (3 %) MIK 128 µg/mL, dok je kod ostalih 25 (86 %) MIK > 128 µg/mL.
- Testirajući amidinobenzimidazolne spojeve na *A. baumannii* ATCC (19606), 1 (3 %) spoj pokazao je MIK 128 µg/mL, dok je ostalih 28 (97 %) pokazalo MIK > 128 µg/mL. Jednake rezultate očitao se i kod *A. baumannii* (9786).
- Minimalna inhibitorna koncentracija 18 (62 %) amidinobenzimidazolnih spojeva na *E. coli* ESBL (26001) iznosila je više od 128 µg/mL, dok su kod 2 (7 %) spoja MIK iznosile 32 µg/mL, kod još 2 (7 %) 64 µg/mL i kod 7 (24 %) 128 µg/mL.
- U istraživanju je vidljiva sposobnost antibakterijskog djelovanja aminidinobenzimidazolnih spojeva na testirane bakterijske vrste, posebno



amidinobenzimidazolnih spojeva na gram – pozitivne vrste kao što su *S. aureus* ATCC (25923) i meticilin – rezistentni *S. aureus* (MRSA) (11710).

- S obzirom na rapidno rastuću rezistenciju na većinu poznatih antibiotika kao i usporeno otkrivanje novih, ove tvari postaju mogući kemoterapeutici, te pokazuju potencijal kemijski modificiranih i nosintetiziranih tvari prema mogućnosti korištenja istih u kliničke svrhe.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Svrha istraživanja bila je testirati osjetljivost multirezistentnih bakterija (*Staphylococcus aureus* ATCC (25923), meticilin – rezistentan *S. aureus* MRSA (11710), *Escherichia coli* ATCC (25922), *Acinetobacter baumannii* ATCC (19606), *Acinetobacter baumannii* (9768), *Escherichia coli* ESBL (26001)) na novosintetizirane amidinobenzimidazolne i kumarinske spojeve mikrodilucijskom metodom, interpretirati rezultate osjetljivosti i usporediti osjetljivost između bakterijskih vrsta.

**Materijali i metode:** U istraživanju su korištene tri bakterijske vrste kliničkih sojeva (MRSA (11710), *E. coli* ESBL (26001), *A. baumannii* (9786)) i tri ATCC soja (*A. baumannii* ATCC (19606), *S. aureus* ATCC (25923), *E. coli* ATCC (25922)) te 29 amidinobenzimidazolnih i 29 kumarinskih spojeva. Nakon uzgoja, pripreme i inkubacije na Cation – adjusted Müller – Hinton bujonu u mikrotitarskim pločicama, očitani su rezultati mikrodilucijskog testa. Rezultati se očitavaju vizualno, usporedbom kontrolnih jažica spojeva i sojeva s testiranim jažicama, a očitava se minimalna inhibitorna koncentracija.

**Rezultati:** Rezultati su pokazali da amidinobenzimidazolni spojevi imaju bolji inhibitorni učinak spram kumarinskih s naglaskom na gram – pozitivne bakterije (na *S. aureus* ATCC (25923) inhibitorno je djelovalo 8 (28 %) spojeva, 28 (97 %) kumarinskih spojeva nije pokazalo osjetljivost; na *S. aureus* MRSA (11710) inhibitornu aktivnost imalo je 11 (38 %) amidinobenzimidazola, a 25 (86 %) kumarinskih spojeva nije pokazalo osjetljivost. Kumarinski spojevi kod gram – negativnih bakterija nisu pokazali inhibitornu aktivnost, a djelovanje amidinobenzimidazolnih spojeva na *E. coli* ESBL (26001) obuhvaća raspon MİK 32 – 128 µg/mL, dok kod ostalih bakterija nisu očitane značajnije minimalne inhibitorne koncentracije.

**Zaključak:** Rezultati ovog istraživanja ukazuju na nove mogućnosti de novo sintetiziranih spojeva kao potencijalnih antibakterijskih kemoterapeutika.

**Ključne riječi:** amidinobenzimidazoli, kumarini, osjetljivost, rezistencija

## 8. SUMMARY

### ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NEWLY SYNTHESIZED AMIDINOENZIMIDAZOLE AND COUMARINE COMPOUNDS

**Objectives:** The aim of this research is to examine the sensitivity of multi – resistant bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin – resistant *S. aureus* MRSA 11710, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Acinetobacter baumannii* 9768, *Escherichia coli* ESBL 26001 to the newly synthesized amidinobenzimidazole and coumarin compounds by the microdilution method, as well as to interpret and compare sensitivity with other bacterial species.

**Material and methods:** Three bacterial species from clinical specimens and three ATCC species with 29 amidinobenzimidazoles and 29 coumarins were used for this research. After cultivation, preparation and incubation in Cation-adjusted Müller – Hinton broth in the 96 – Well microtiter plates, microdilution test results were read visually, comparing control wells of compounds and strains with the tested wells. Minimal inhibitory concentrations was determined.

**Results:** Results showed that amidinobenzimidazole compounds had a better inhibitory effect than coumarins with emphasis on gram – positive bacteria such as *S. aureus* ATCC 25923 (there were 8 (28 %) out 29 (100 %) amidinobenzimidazole compounds that showed sensitivity and 28 (97 %) coumarins did not show sensitivity) and methicillin – resistant *S. aureus* (MRSA) 11710 (11 (38 %) amidinobenzimidazoles showed sensitivity and 25 (86 %) coumarin did not). Coumarin compounds in gram – negative bacteria showed no inhibitory activity, but amidinobenzimidazole compounds have showed range of MICs 32 – 128 µg/mL, while in other bacteria no significant minimum inhibitory concentrations were read.

**Conclusion:** The results of this study indicate new possibilities of de novo synthesized compounds as potential antibacterial drugs.

**Keywords:** amidinobenzimidazole, coumarin, resistance, sensitivity

## 9. LITERATURA

1. Lobanovska M, Pilla G. *Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?*. Yale J Biol Med. 2017;90(1):135-145. Published 2017 Mar 29.
2. Davies J, Davies D. *Origins and evolution of antibiotic resistance*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
3. Kalenić S i sur. 2013. *Medicinska mikrobiologija*. 14. izd. Medicinska naklada. Zagreb.
4. Santajit S, Indrawattana N. 2016. *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. *BioMed Research International*/2016:2475067. doi:10.1155/2016/2475067
5. Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Pearsall NN, Nester MT. *Microbiology: A human perspective*. 4. izd. New York: McGraw-Hill; 2004.
6. Tacconelli, E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet D. i sur. 2018. *Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis [Abstract]*. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327. doi:10.1016/s1473-3099(17)30753-3
7. Lance R. Peterson, *Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE Revisited*, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 49, Issue 6, 15 September 2009, Pages 992–993, <https://doi.org/10.1086/605539>
8. Xia J, Gao J, Tang W. *Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance*. *BioScience Trends*. 2016; 10(1):14-21.
9. Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. *Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii infections*. *Drugs*. 2014;74(12):1315-1333. doi:10.1007/s40265-014-0267-8
10. Lee YT, Wang YC, Kuo SC, et al. *Multicenter Study of Clinical Features of Breakthrough Acinetobacter Bacteremia during Carbapenem Therapy*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(9):e00931-17. Published 2017 Aug 24. doi:10.1128/AAC.00931-17
11. Brodrick HJ, Raven KE, Kallonen T, et al. *Longitudinal genomic surveillance of multidrug-resistant Escherichia coli carriage in a long-term care facility in the*

- United Kingdom. Genome Med.* 2017;9(1):70. Published 2017 Jul 25.  
doi:10.1186/s13073-017-0457-6
12. Asanin J, Misic D, Aksentijevic K, et al. *Genetic Profiling and Comparison of Human and Animal Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates from Serbia.* *Antibiotics (Basel).* 2019;8(1):26. Published 2019 Mar 16.  
doi:10.3390/antibiotics8010026
13. Mairi A, Touati A, Lavigne JP. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ST80 Clone: A Systematic Review.* *Toxins (Basel).* 2020;12(2):119. Published 2020 Feb 14.  
doi:10.3390/toxins12020119
14. Song D, Ma S. *Recent Development of Benzimidazole-Containing Antibacterial Agents.* *ChemMedChem.* 2016;11(7):646-659. doi:10.1002/cmdc.201600041
15. Keri RS, Hiremathad A, Budagumpi S, Nagaraja BM. *Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole-Based Medicinal Chemistry.* *Chem Biol Drug Des.* 2015;86(1):19-65. doi:10.1111/cbdd.12462
16. Bistrović A, Krstulović L, Stolić I, et al. *Synthesis, anti-bacterial and anti-protozoal activities of amidinobenzimidazole derivatives and their interactions with DNA and RNA.* *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018;33(1):1323-1334.  
doi:10.1080/14756366.2018.1484733
17. Kovačić I. *Sinteza novih derivata kumarina i L-askorbinske kiseline primjenom klik kemije* [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; 2015 [pristupljeno 24.08.2020.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:842777>
18. Qu D, Li J, Yang XH, et al. *New biscoumarin derivatives: synthesis, crystal structure, theoretical study and antibacterial activity against Staphylococcus aureus.* *Molecules.* 2014;19(12):19868-19879. Published 2014 Nov 28.  
doi:10.3390/molecules191219868
19. de Araújo RS, Barbosa-Filho JM, Scotti MT, et al. *Modulation of Drug Resistance in Staphylococcus aureus with Coumarin Derivatives.* *Scientifica (Cairo).* 2016; 2016:6894758. doi:10.1155/2016/6894758
20. Alasmay FA, Snelling AM, Zain ME, Alafeefy AM, Awaad AS, Karodia N. *Synthesis and Evaluation of Selected Benzimidazole Derivatives as Potential*

- Antimicrobial Agents*. *Molecules*. 2015;20(8):15206-15223. Published 2015 Aug 20. doi:10.3390/molecules200815206
21. Bansal S, Sinha D, Singh M, Cheng B, Tse-Dinh YC, Tandon V. 3,4-dimethoxyphenyl bis-benzimidazole, a novel DNA topoisomerase inhibitor that preferentially targets *Escherichia coli* topoisomerase I. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(12):2882-2891. doi:10.1093/jac/dks322
22. Chamberlin J, Story S, Ranjan N, Chesser G, Arya DP. *Gram-negative synergy and mechanism of action of alkynyl bisbenzimidazoles*. *Sci Rep*. 2019;9(1):14171. Published 2019 Oct 2. doi:10.1038/s41598-019-48898-4
23. Cevik UA, Saglik BN, Ozkay Y, et al. *Synthesis of New Fluoro-Benzimidazole Derivatives as an Approach towards the Discovery of Novel Intestinal Antiseptic Drug Candidates*. *Curr Pharm Des*. 2017;23(15):2276-2286. doi:10.2174/1381612822666161201150131
24. Alnufaie R, Raj Kc H, Alsup N, et al. *Synthesis and Antimicrobial Studies of Coumarin-Substituted Pyrazole Derivatives as Potent Anti-Staphylococcus aureus Agents*. *Molecules*. 2020;25(12):2758. Published 2020 Jun 15. doi:10.3390/molecules25122758
25. Qu D, Hou Z, Li J, et al. *A new coumarin compound DCH combats methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm by targeting arginine repressor*. *Sci Adv*. 2020;6(30):eaay9597. Published 2020 Jul 22. doi:10.1126/sciadv.aay9597
26. Talapko J, Drenjančević D. *Mikrobiološke metode ispitivanja antibakterijske aktivnosti novosintetiziranih spojeva*. In: Knjiga sažetaka, 15. Konferencija o laboratorijskoj dijagnostici (s međunarodnim sudjelovanjem) "Osnovne i napredne tehnologije u službi sigurnosti i kvalitete laboratorijske medicine", Osijek, HLU; 2016. 2016 Jan 1 (p. 15).

## 10. ŽIVOTOPIS

Vlatka Stojčić

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Medicinski fakultet Osijek

Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Josipa Hutlera 4, 31000 Osijek

Datum i mjesto rođenja: 4. srpnja 1996., Vinkovci

Kućna adresa: Vatrogasna 22, 32100 Vinkovci

Broj telefona: +385996979465

E – mail: [vstojacic@gmail.com](mailto:vstojacic@gmail.com)

Obrazovanje:

2003. – 2011.: Osnovna škola Ivana Mažuranića Vinkovci;

2011. – 2015.: Prirodoslovno-matematička gimnazija, Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci;

2015. – 2018.: Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika, Osijek;

2018. – 2020.: Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika, Osijek

Članstvo i aktivnosti u znanstvenim i strukovnim udrugama:

2015. – 2018. CMLDSA (Hrvatska udruga studenata medicinsko – laboratorijske dijagnostike)