

# Interakcije 4''-piridin-3-il- i 4''-(4-trifluormetoksifenil)-makrozona s biološkim metama

---

**Kapustić, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:127491>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Monika Kapustić

**INTERAKCIJE 4''-PIRIDIN-3-IL- I 4''-(4-  
TRIFLUORMETOKSIFENIL)-MAKROZONA  
S BIOLOŠKIM METAMA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2023. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Tomislava Jednačka.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije, voditelj projekta: prof. dr. sc. Predrag Novak (IP-2018-01-8098).

## Zahvale

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Predragu Novaku na pruženoj prilici za izradu ovog rada. Najviše se zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Tomislavu Jednačku, na pruženoj prilici te na svojoj pomoći prilikom izrade i pisanja rada. Hvala na strpljivosti te svim brzim ispravicima!

Hvala mojoj obitelji na podršci i ohrabrenju svih ovih godina. Hvala vam što ste mi bili najbolja podrška koju sam mogla zamisliti i bili uz mene kad je to bilo najpotrebnije.

Želim se zahvaliti i ekipi iz Kućice: Fran, Tei, Bojanu, Ivanu i Igoru koji su bili uz mene od samog početka studiranja, u svim lijepim, ali i malo manje lijepim situacijama. Treba dodati i Franju koji nam se kasnije pridružio. Lijepo je kraj sebe imati ljude koji razumiju tvoje probleme i, iako ne mogu uvijek pomoći, uvijek budu uz tebe kad je to potrebno. Vaše prijateljstvo mi puno znači i nadam se da ćemo i u buduće pobjede koračati zajedno.

Isto tako hvala i Luciji, Miji, Ani, Robertu, Aleksu, Toniju i Petri na svim šalama, stickerima, smijehu i zajedničkim druženjima. Hvala što ste mi pomogli da sve teške situacije prođem sa osmijehom i uz šalu. Uvijek ću pamtit i sva naša druženja i nadam se da će ih u budućnosti biti još i više.

Hvala mojim curama, Karli i Iris, koje su bile sa mnom još od malih nogu. Hvala što ste mi uljepšale osnovnoškolske, srednjoškolske te fakultetske dane. Hvala za svaku zajedničku kavu, čaj, druženje, izlazak i sve ostalo što smo prošle zajedno. Nadam se da ćemo uvijek ostati zajedno i skupiti još mnogo zajedničkih uspomena!

I za kraj najveće hvala ide mojoj mami koja je najviše zaslužna za to kakva sam osoba postala i za sve što sam do sad postigla. Mama hvala ti na svom odricanju, trudu, podršci i ljubavi koju si mi pružila! Bez tebe ne bih bila tu gdje jesam i još jednom ti želim reći, veliko hvala!

# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Ribosom.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Struktura i uloga ribosoma .....</i>	<i>2</i>
<b>2.2. Biosinteza proteina.....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. Makrolidni antibiotici.....</b>	<b>6</b>
2.3.1. <i>Otkriće i struktura.....</i>	<i>6</i>
2.3.2. <i>Eritromicin A i njegovi derivati .....</i>	<i>7</i>
2.3.3. <i>Mehanizam djelovanja makrolida.....</i>	<i>10</i>
2.3.4. <i>Bakterijska rezistencija.....</i>	<i>11</i>
<b>2.4. Makrozoni.....</b>	<b>12</b>
2.4.1. <i>Tiosemikarbazoni.....</i>	<i>12</i>
2.4.2. <i>Interakcije makrozona i ribosoma .....</i>	<i>13</i>
<b>2.5. Spektrofluorimetrijske metode.....</b>	<b>13</b>
2.5.2. <i>Primjena fluorescencijske spektroskopije .....</i>	<i>15</i>
2.5.3. <i>Spektrofluorimetrija uz kompetitor .....</i>	<i>15</i>
2.5.4. <i>Gašenje flouescencije .....</i>	<i>16</i>
<b>2.6. Ostale metode za određivanje strukture i interakcija makrolida.....</b>	<b>17</b>
2.6.1. <i>Interakcije s biološkim metama.....</i>	<i>18</i>
2.6.2. <i>Interakcije makrolida s proteinima iz plazme.....</i>	<i>19</i>
2.6.3. <i>Cirkularni dikroizam.....</i>	<i>19</i>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>21</b>
3.1.1. <i>Mjerenja UV-Vis .....</i>	<i>21</i>
3.1.2. <i>Fluorimetrijska mjerenja .....</i>	<i>23</i>
3.1.3. <i>Cirkularni dikroizam.....</i>	<i>24</i>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Spektrofotometrijska mjerenja.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Fluorimetrijska mjerenja .....</b>	<b>29</b>
4.2.1. <i>Interakcije makrozona s BSA .....</i>	<i>30</i>

---

4.2.2. <i>Interakcije makrozona s ribosomom</i> .....	32
<b>4.3. Cirkularni dikroizam</b> .....	<b>40</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>43</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)</b> .....	<b>44</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>45</b>
<b>§ 8. DODATAK</b> .....	<b>XLVIII</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>LI</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### INTERAKCIJE 4"-PIRIDIN-3-IL- I 4"-(4-TRIFLUORMETOKSIFENIL)- MAKROZONA S BIOLOŠKIM METAMA

Monika Kapustić

Makrolidni antibiotici pripadaju skupni makrolida koji se široko primjenjuju za liječenje infekcija gornjih i donjih dišnih puteva. Mehanizam djelovanja makrolida temelji se na vezanju za 23S rRNA u peptidil-transferaznom centru bakterijskog ribosoma ili u njegovoj blizini, što sprječava izlaz nosintetiziranih peptida i inhibira sintezu proteina. Pojava višestruke bakterijske rezistencije predstavlja ozbiljnu prijetnju za ljudsko zdravlje, što je potaknulo sintezu novih derivata makrolida koji će pokazivati bolju bioaktivnost. Vezanjem poznatih makrolida i bioaktivnih tiosemikarbazona dobiveni su novi konjugati, makrozoni, koji uspješno djeluju protiv nekih rezistentnih bakterijskih sojeva.

U ovom radu okarakterizirane su interakcije nekoliko 4"-aril-makrozona s biološkim metama, poput albumina iz goveđeg seruma te ribosoma iz bakterije *Escherichia coli*. Istraživanja su provedena kombinacijom metoda spektrofluorimetrije, spektrofotometrije i cirkularnog dikroizma. Kao kompetitor u fluorimetrijskim mjerenjima korišten je flourescirajući derivat azitromicina, 9a-NBD-azitromicin. Podaci su zatim obrađeni metodama multivarijatne analize kako bi se odredile konstante vezanja.

(46 stranica, 25 slika, 6 tablica, 44 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: bakterije, makrolidi, makrozoni, rezistencija, ribosom, spektrofluorimetrija

Mentor: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Tomislav Jednačak
  2. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
  3. doc. dr. sc. Nikola Cindro
- Zamjena: prof. dr. sc. Predrag Novak

Datum diplomskog ispita: 17. ožujka 2023.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### INTERACTIONS OF 4''-PYRIDINE-3-YL- AND 4''-(4-TRIFLUOROMETHOXYPHENYL)- MACROZONES WITH BIOLOGICAL TARGETS

Monika Kapustić

Due to their anti-infective activity, macrolide antibiotics (macrolides) are widely used for the treatment of upper and lower respiratory tract infections. Their mechanism of action is based on reversible binding to 23S rRNA at or near the peptidyl-transferase center of the bacterial ribosome, which prevents the release of newly synthesized peptides and inhibits the protein synthesis. The emergence of bacterial resistance represents a serious threat to human health, which prompted the synthesis of new macrolide derivatives with a better bioactivity. Linking known macrolides to bioactive thiosemicarbazones resulted with new conjugates, macrozones, active against some resistant bacterial strains.

In this work, the interactions of several 4''-aryl-macrozones with biological targets, such as bovine serum albumin and *Escherichia coli* ribosomes, were characterized. The studies were carried out by combining spectrofluorimetric, spectrophotometric and circular dichroism methods. Competition fluorimetric experiments were conducted using a fluorescent derivative of azithromycin, 9a-NBD-azithromycin. The data were further processed with multivariate analysis methods to determine the binding constants.

(46 pages, 25 figures, 6 tables, 44 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: bacteria, macrolides, macrozones, resistance, ribosome, spectrofluorimetry

Mentor: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Reviewers:

1. Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor
  2. Dr. Mirta Rubčić, Full Professor
  3. Dr. Nikola Cindro, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Predrag Novak, Full Professor Tenure

Date of exam: March 17<sup>th</sup> 2023



## § 1. UVOD

Makrolidni antibiotici pripadaju skupini makrolida i primarno se koriste za liječenje infekcija gornjih i donjih dišnih puteva uzrokovanih Gram-pozitivnim i nekim Gram-negativnim bakterijama. Strukturu makrolida čini makrolaktonski prsten od 12–16 ugljikovih atoma na koji su obično vezane dvije šećerne jedinice, desozamin i kladinoza. Osim antibakterijskog djelovanja, zabilježena je i njihova protuupalna, antikancerogena i antimalarijska aktivnost. Antibakterijsko djelovanje postižu vezanjem za 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma i tako sprječavaju sintezu proteina.<sup>1,2</sup>

Prvi izolirani makrolid je pikromicin, 14-člani makrolid izoliran iz soja *Streptomyces* 1950. godine<sup>3,4</sup>, a nedugo potom izoliran je i najvažniji prirodni makrolid eritromicin A iz soja *Saccharopolyspora erythraea*.<sup>2</sup> Klinička primjena prirodnih makrolida ograničena je zbog nepovoljnih farmakokinetičkih svojstava te zbog nestabilnosti u kiseloj okolini želuca. Navedeni nedostaci potaknuli su razvoj polusintetskih derivata iz prirodnih makrolida metodama esterifikacije, strukturnim modifikacijama ili formiranjem soli.<sup>2</sup> Azitromicin je petnaesteročlani polusintetski derivat eritromicina sa znatno boljim fizikalno-kemijskim svojstvima i širim spektrom antibakterijskog djelovanja. Povećana stabilnost i bolja farmakokinetička svojstva posljedica su uvođenja atoma dušika u aglikonski prsten.<sup>2</sup>

Povećana i nekontrolirana upotreba makrolidnih antibiotika neizbježno je dovela do prilagođavanja patogenih vrsta te brzog širenja bakterijske rezistencije. Stoga su istraživanja usmjerena prema otkriću i dizajnu antibiotika sa širim spektrom antimikrobne aktivnosti. U procesu razvoja nekog antibiotika važno je odrediti njegov mehanizam djelovanja, interakcije s biološkim metama te konformacije u slobodnom i vezanom stanju. Takve informacije važne su za poboljšanje farmakokinetičkih svojstava i bioaktivnosti nove klase lijekova.<sup>5</sup>

Makrozoni, novi tiosemikarbazonski derivati, imaju dobar potencijal za dizajn antibiotika sa znatno širim spektrom djelovanja.<sup>5</sup> Cilj ovog istraživanja je karakterizacija interakcija 4"-aril-makrozona (1–3) s biološkim metama, albuminom iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) i 70S ribosomom iz bakterije *Escherichia coli* pomoću metoda spektrofluorimetrije, spektrofotometrije i cirkularnog dikroizma. Kombinacijom dobivenih podataka određene su konstante i stehiometrija vezanja.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Ribosom

Ribosom je makromolekulski kompleks čija je uloga primanje signala od glasničke RNA (mRNA) te prijenos genetičkog koda na lance aminokiselina. Aminokiseline se zatim smataju i tvore proteine u stanicama.<sup>6</sup>

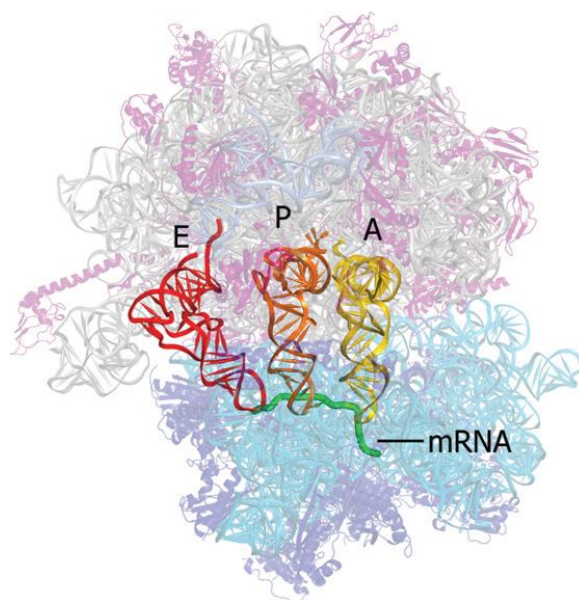
Kristalna struktura ribosoma riješena je 2000. godine proučavanjem bakterije *Thermus thermophilus* iz koje su dobivene informacije o maloj podjedinici i arheobakterije *Haloarcula marismortui* iz koje su dobivene informacije o velikoj podjedinici.<sup>6</sup> Veličina ribosoma i njegovih podjedinica mjeri se Svedbergovim jedinicama koje odgovaraju vremenu potrebnom da se čestica istaloži centrifugiranjem. Prokariotski i eukariotski ribosomi se razlikuju po veličini, a princip rada im je vrlo sličan. Prokariotski ribosomi (70S) sadrže tri molekule RNA, dok eukariotski ribosomi (80S) sadrže četiri molekule RNA i nešto više proteina.<sup>6</sup>

#### 2.1.1. Struktura i uloga ribosoma

Ribosom se sastoji od dvije asimetrične jedinice, velike (50S) i male (30S), koje okružuju molekulu mRNA kada krene faza translacije. Svaka podjedinica je kombinacija proteina i ribosomske RNA (rRNA). Mala podjedinica sadrži jednu molekulu rRNA koja se u bakterijama naziva 16S RNA i 21 različit protein (S1 do S21). Velika podjedinica sadrži jednu malu rRNA koja se naziva 5S RNA, jednu veliku RNA koja se naziva 23S RNA i 34 različitih proteina (L1 do L136). Molekula rRNA varira u veličini u različitim vrstama ili organelima, a okružena je velikim brojem proteina. Sudjeluje u vezanju mRNA i tRNA na ribosom i djeluje kao katalizator kod tvorbe peptidnih veza između aminokiselina.<sup>6</sup>

Tijekom različitih procesa u biosintezi proteina dolazi do konformacijskih promjena u proteinima ribosoma što uzrokuje promjenu oblika ribosoma. Na ribosomu se nalaze tri različita vezna mjesta za molekule tRNA: A, P i E. Aminoacilno mjesto (A) je mjesto gdje dolazi do ulaska novih aminokiselina u obliku kompleksa aminoacil-tRNA. Dodavanjem aminokiseline u rastući lanac dolazi do pomaka tRNA s mjesta A u mjesto P. Peptidilno vezno mjesto (P) veže peptidil-tRNA, odnosno tRNA na koju je vezan rastući polipeptidni

lanac. Zadnji korak je pomak deacilirane tRNA na E mjesto, gdje disocira iz ribosoma bez svoje aminokiseline.<sup>6</sup>



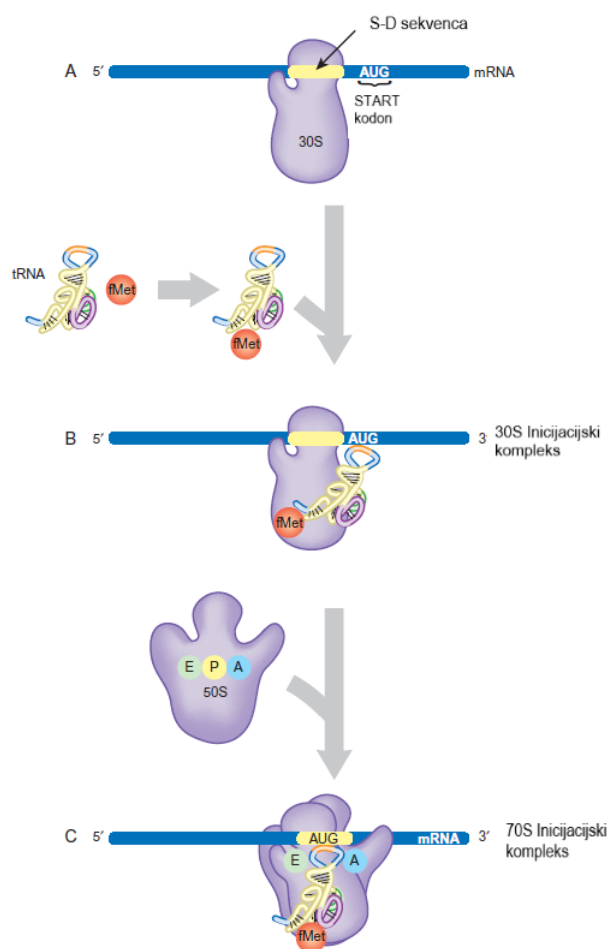
Slika 1. Bakterijski (70 S) ribosom s velikom podjedinicom gore (siva RNA i ljubičasti proteini) i malom dolje (svjetlo plava RNA i tamno plavi proteini). Prikaz A-, P- i E- veznih mjesta za tRNA te mRNA.<sup>6</sup>

## 2.2. Biosinteza proteina

Proteini imaju ključnu ulogu u mnogim staničnim procesima: kao enzimi ubrzavaju biokemijske reakcije, vežu i prenose bioaktivne tvari, dio su signalnih puteva u organizmu te su važan strukturni čimbenik u stanicama i tkivima. Različiti proteini zahtijevaju specifične modifikacije i transport do područja stanice u kojima imaju određenu funkciju. Ribosomi proizvode veliki broj proteina različite namjene. Po težini stanice, oko 20% čine proteini. Prosječna stanica može imati 10 000 različitih proteina s prosjekom od milijun kopija svakog. Biosinteza proteina može se podijeliti na dva glavna koraka, transkripciju i translaciju. Prva faza je transkripcija informacije s DNA na mRNA, nakon čega se u procesu translacije informacija iz mRNA prevodi u slijed aminokiselina koje tvore polipeptidni lanac. Postupak sinteze nešto se razlikuje u prokariotskim i eukariotskim stanicama, najviše po mjestu odvijanja. Kod prokariota se translacija i transkripcija odvijaju u citoplazmi, dok se kod eukariota transkripcija odvija u jezgri, a translacija u citoplazmi. Prijenos informacija u

biološkim stanicama s DNA na RNA pa na proteine smatra se centralnom dogmom molekularne biologije, a prvi ju je formulirao Sir Francis Crick.<sup>7</sup>

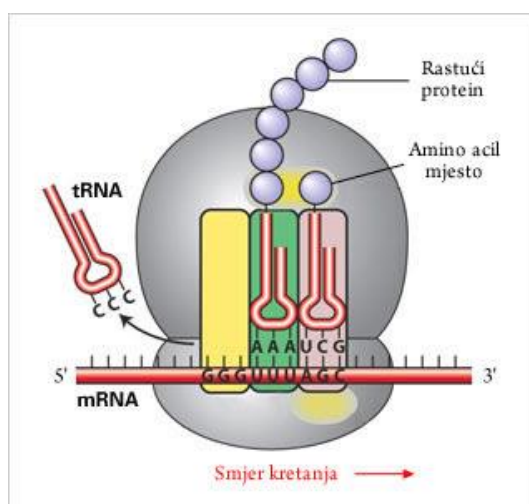
Faza translacije u prokariotima se može podijeliti na tri koraka: inicijaciju, elongaciju i terminaciju. Svaka molekula mRNA građena je od četiri različite nukleinske baze koje se još nazivaju i nukleinske kiseline. Parovi baza se čitaju u serijama po tri tvoreći kodone, a svaki kodon specifičan je za određenu aminokiselinu. Postoji dvadeset različitih aminokiselina, a kodoni koji odgovaraju pojedinoj aminokiselini su univerzalni. Početni kodon svakog proteina je „AUG“ što označava adenin, uracil i gvanin. Posebna molekula RNA koja može vezati aminokiseline zove se prijenosna RNA (tRNA). Ona prepoznaje početni slijed na mRNA („očitava“ kodon na mRNA) i veže se za nju. Posebna tRNA koja započinje sintezu nosi kemijski označen metionin, N-formil-metionin (fMet). Dalje, ovisno o proteinu koji se sintetizira, može slijediti bilo koja od dvadeset aminokiselina.<sup>7</sup>



Slika 2. Prikaz formiranja inicijacijskih kompleksa. A) Vežanje male podjedinice i mRNA preko Shine-Dalgarno sekvence s prikazanim start kodonom. B) Inicijacijska tRNA s vezanim fMet veže se na AUG kodon. C) Velika podjedinica ribosoma veže se na malu i smješta tRNA u P mjesto.<sup>7</sup>

Prije početka sinteze proteina, dvije jedinice ribosoma su razdvojene. Na 5' kraju mRNA nalazi se posebna sekvenca zvana Shine-Dalgarno sekvenca, dok se na 3' kraju 16S rRNA nalazi komplementaran niz, anti-Shine-Dalgarno niz. Translacija počinje vezanjem slobodne male podjedinice (16S) na Shine-Dalgarnov slijed mRNA, a vezanje se ostvaruje sparivanjem komplementarnih baza. Nakon Shine-Dalgarno sekvence, sljedeći AUG kodon je start kodon. Inicijacijska tRNA, koja nosi fMet, prepoznaje start kodon te se veže na njega pri čemu dolazi do povezivanja velike i male podjedinice ribosoma te nastanka kompleksa mRNA, ribosoma i inicijacijske tRNA (slika 2.C). 23S rRNA koja se nalazi u velikoj podjedinici ribosoma katalizira stvaranje peptidne veze tvoreći peptidil-transferazni centar

ribosoma. U nekom trenutku, na ribosomu mogu istovremeno biti vezane samo dvije nabijene tRNA. S obzirom da se inicijacijska tRNA smješta u P mjesto na ribosomu, nova aminoacil-tRNA veže se na A mjesto ribosoma. Nakon prijenosa fMet s tRNA na rastući polipeptidni lanac, deacilirana tRNA se pomiče u E mjesto te disocira iz ribosoma bez svoje aminokiseline. Istovremeno se peptidil-tRNA pomiče u P mjesto i proces elongacije se nastavlja sve do pojave STOP kodona na mRNA, čime kreće terminacija sinteze. Faktori otpuštanja prepoznaju STOP kodon te aktiviraju peptidil-transferazu koja hidrolizira vezu između gotovog polipeptidnog lanca i tRNA. Novonastali polipeptidni lanac tada napušta ribosom kroz izlazni kanal na 50S podjedinici i prenosi se do odgovarajućih stanica u organizmu. Općenito, ribosom može povezati otprilike 3 do 5 aminokiselina u sekundi.<sup>7</sup>



Slika 3. Prikaz veznih mjesta na ribosomu tijekom faze elongacije. Peptidil-tRNA nalazi se u P veznom mjestu, nova aminoacil-tRNA veže se u A mjestu, a slobodna tRNA koja je otpustila svoju aminokiselinu disocira iz E veznog mjesta.<sup>8</sup>

## 2.3. Makrolidni antibiotici

### 2.3.1. Otkriće i struktura

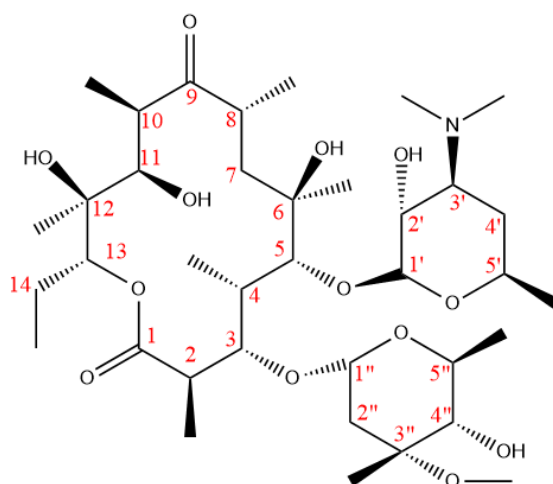
Makrolidni antibiotici (makrolidi) su spojevi s makrolaktonskim prstenom koji može imati od 12 do 16 ugljikovih atoma. Prsten može biti supstituiran hidroksilnim ili alkilnim skupinama te saharidnim jedinicama, poput desozamina i/ili kladinoze.<sup>1-3</sup> Prvi makrolid pikromicin

izoliran je 1950. godine iz soja *Streptomyces*, a prvotno se smatralo da je on samo izomer metimicina koji u strukturi ima dvanaesteročlani makrolaktonski prsten. Tek su 1957. godine Brockmann i suradnici uspjeli identificirati njegovu strukturu koju čini četrnaesteročlani laktonski prsten s vezanim šećerom D-desozaminom.<sup>4</sup>

### 2.3.2. Eritromicin A i njegovi derivati

Makrolidi se obzirom na svojstva i strukturu mogu podijeliti na četiri generacije. Glavni predstavnik prve generacije makrolidnih antibiotika, četrnaesteročlani makrolid eritromicin A, izoliran je iz soja *Streptomyces erythrae* 1952. godine. Koristio se za liječenje infekcija gornjeg respiratornog trakta te infekcija kože i mekog tkiva. Spektar djelovanja eritromicina uključuje Gram-pozitivne bakterije (npr. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*) kao i atipične patogene (*Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Clamidia pneumoniae*). Međutim, nuspojave poput gastrointestinalne intolerancije, loše oralne bioraspodivnosti, kratkog vremena poluživota te interakcije s drugim lijekovima, ograničile su njegovu upotrebu.<sup>1,2</sup>

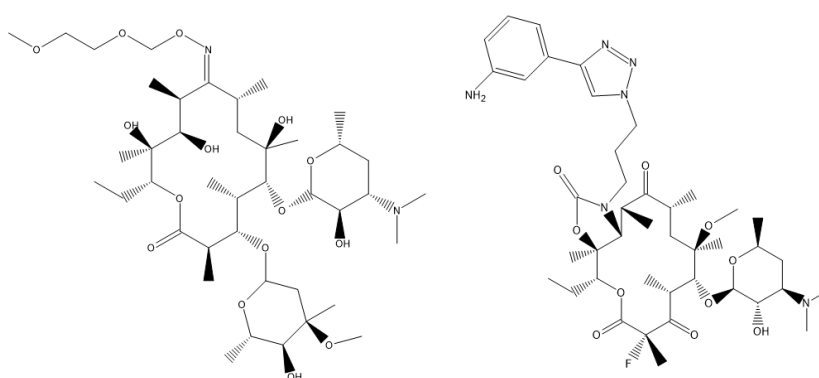
Struktura eritromicina prikazana je na slici 4. Okosnicu molekule čini laktonski prsten koji ima vezana dva monosaharida, kladinozu na položaju C3 i desozamin na položaju C5. U kiseloj sredini želuca raspada se na neaktivni anhidropoluketal te dalje do spiroketala. Pretpostavlja se da je poluketal kao međuprodukt odgovoran za želučane nuspojave vezane uz eritromicin.<sup>1,2</sup>



Slika 4. Struktura molekule eritromicina A s brojanjem atoma.

Njegova nestabilnost potaknula je razvoj novih klasa makrolida. Najnestabilniji dijelovi molekule eritromicina i potencijalna mjesta raspada su keton na položaju C9, vodik na C8, hidroksilna skupina na C6 te dioli na položajima C11 i C12. Stoga je uvođenje modifikacija na navedenim mjestima povećalo stabilnost molekule.<sup>2</sup>

Prvi derivat eritromicina bio je roksitromicin. Roksitromicin nastaje modifikacijom ketona na položaju C9 u oksim. Takva modifikacija povećava stabilnost roksitromicina u kiselom mediju, ali ne utječe na aktivnost *in vitro*.<sup>2</sup>



Slika 5. Strukture derivata eritromicina: a) roksitromicin, b) solitromicin.

Sljedeći derivat je klaritromicin (6-*O*-metileritromicin) koji nastaje alkiliranjem hidroksilne skupine na položaju C6. Na taj način povećana je stabilnost u kiseloj sredini te spriječena degradacija do poluketalnog međuprodukta. Stoga se klaritromicin može smatrati predstavnikom prve generacije polusintetskih makrolida. Veća stabilnost u kiseloj sredini rezultirala je i većom oralnom bioraspodivošću te manjom želučanom intolerancijom. Posjeduje jednaku ili čak i veću aktivnost *in vitro* od eritromicina protiv sličnih patogena, a klinički je dostupan u obliku granula i tableta za oralnu upotrebu.<sup>1,2</sup>

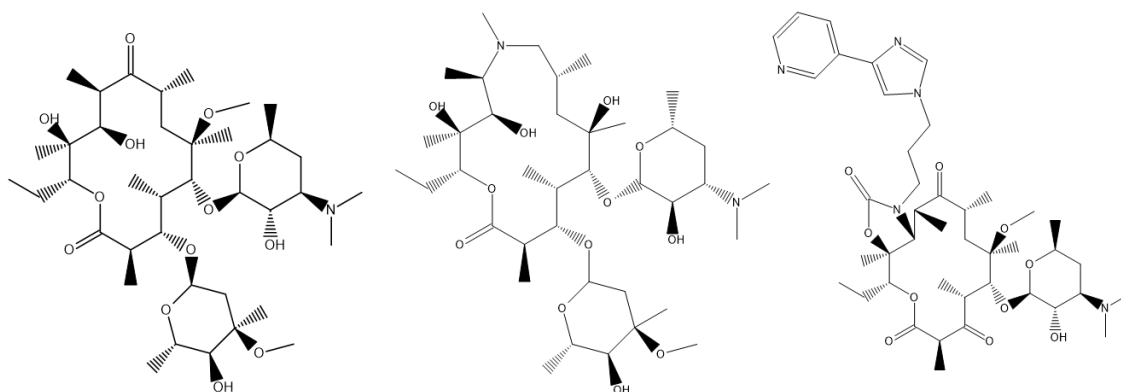
Predstavnik druge generacije makrolida je azitromicin (9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin). Predstavnici ove skupine petnaesteročlanih derivata eritromicina nazivaju se i azalidi. Azitromicin nastaje adicijom dušika supstituiranog metilnom skupinom na mjesto karbonilne skupine na položaju 9a aglikonskog prstena, odnosno uvođenjem atoma dušika u aglikonski prsten. Modifikacija u strukturi čini ga stabilnijim u kiselom mediju, povećava mu vrijeme poluživota u serumu i prodiranje u tkiva. Spektar djelovanja azitromicina uključuje



Gram-pozitivne i neke Gram-negativne bakterije, što ga čini učinkovitijim od samog eritromicina. Na tržištu je prisutan u obliku tableta različitih doza (250, 500, 600 mg), oralnih suspenzija ili ga se može ubrizgavati intravenozno.<sup>1</sup>

Treću generaciju makrolida čine ketolidi, polusintetski derivati eritromicina nastali uvođenjem keto skupine na položaj C3. Njihova aktivnost *in vitro* uključuje i Gram-pozitivne bakterije, poput *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes*. Glavni predstavnik ove generacije je telitromicin. Ketolidi su sintetizirani supstituiranjem  $\alpha$ -L-kladinoze keto skupinom u položaju 3. Promjena u strukturi čini ih puno stabilnijima u kiseljoj okolini. Telitromicin je sintetiziran ciklizacijom atoma C11-12 tvoreći tako karbamatni prsten s dodatnom imidazo-piridilnom skupinom. Taj dio molekule pospješuje vezanje za bakterijski ribosom i aktivnost telitromicina *in vitro*.<sup>1,9</sup>

Međutim, zbog izazivanja niza nuspojava, telitromicin je povučen s tržišta. Zbog toga je došlo i do razvoja četvrte generacije makrolidnih antibiotika. Predstavnik četvrte generacije makrolida je solitromicin koji je strukturno vrlo sličan telitromicinu. Unatoč antibakterijskom djelovanju, FDA (engl. *Food and Drug Administration*) još nije odobrila solitromicin kao lijek zbog mogućih nuspojava.<sup>1</sup>



Slika 6. Strukture predstavnika različitih generacija makrolida: a) klaritromicin, b) azitromicin, c) telitromicin.

### 2.3.3. *Mehanizam djelovanja makrolida*

Makrolidni i ketolidni antibiotici su bakteriostatski reagensi koji svoj antibakterijski učinak postižu reverzibilnim vezanjem na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma. Vežu se na domenu V 23S ribosomske RNA (rRNA), na ili u blizini peptidil-transferaznog centra, unutar tunela gdje izlaze novonastali peptidi.<sup>2</sup>

Točan mehanizam djelovanja makrolida nije moguće utvrditi, no predloženo je više mogućih mehanizama, ovisno o strukturi makrolida. Objavljena su četiri glavna mehanizma inhibicije sinteze proteina, a to su:

- inhibicija elongacije početnog peptidnog lanca tijekom rane faze translacije,
- poticanje disocijacije peptidil-tRNA s ribosoma,
- inhibicija stvaranja peptidne veze te
- interferencija sa 50S podjedinicom ribosoma.<sup>1,2</sup>

U prvom od predloženih mehanizama smatra se da makrolidi inhibiraju peptidil-transferaznu aktivnost, odnosno blokiraju elongaciju. Tijekom elongacije dolazi do dodavanja nove aminokiseline na rastući peptidni lanac, što katalizira enzim peptidil-transferaza. Nakon toga slijedi translokacija rastućeg peptidnog lanca s A na P mjesto. Šesnaesteročlani makrolidi su vjerojatno odgovorni za inhibiciju peptidil-transferaze, dok su četrnaesteročlani makrolidi odgovorni za blokiranje translokacije.<sup>2</sup>

Tijekom translokacije, uslijed slabljenja veza između ribosoma i peptidilne tRNA, može doći i do disocijacije peptidilne tRNA. To obuhvaća drugi pretpostavljeni mehanizam djelovanja makrolida - poticanje disocijacije peptidilne tRNA s ribosoma. Dokaz tome je pojava povećane koncentracije peptidilne tRNA u prisutnosti makrolida.<sup>2</sup>

Ketolidi se također vežu za 23S rRNA, no za razliku od makrolida njihov je afinitet za nemetilirane ribosome 10–100 puta veći, a moguće je i vezanje na metilirane ribosome. S druge strane, kod makrolida je zabilježeno isključivo vezanje na nemetilirane ribosome. Zbog karbamata u položajima C11 i C12, ketolidi se vežu na domenu II bakterijske rRNA.<sup>2</sup>

#### 2.3.4. Bakterijska rezistencija

Zbog svoje visoke efikasnosti i sigurnosti, makrolidi su široko primjenjivani među osobama intolerantnima na penicilin. Međutim, široka i nekontrolirana upotreba makrolida povećala je bakterijsku rezistenciju što je ograničilo učinkovitost ovih lijekova. Bakterijska rezistencija na makrolide uočena je već 1956. godine, samo nekoliko godina nakon početka kliničke uporabe eritromicina.<sup>1,2</sup>

Postoji pet osnovnih mehanizama aktivne bakterijske rezistencije:

- izbacivanje antibiotika iz stanice (efluks);
- modifikacija 23S RNA kao mete antibiotika;
- deaktivacija makrolidnih antibiotika selektivnim vezanjem i kovalentnom modifikacijom (glikozilacija, fosforilacija, acetiliranje, otvaranje prstena);
- mehanizam zaštite ribosoma pomoću proteina ABC-F (engl. *ATP-binding cassette F*);
- stvaranje biofilмова kao „lažnih“ meta na površini bakterijskih stanica.<sup>10</sup>

Prvi mehanizam se temelji na tzv. aktivnom efluksu, gdje bakterija smanjuje unutarstaničnu koncentraciju antibiotika izbacujući ga iz stanice pomoću membranskih crpki M-, MS-, aktinomicitnog ili MDR-tipa. Sljedeći mehanizam uključuje modifikacije ciljnog mjesta 23S rRNA, A2058. Enzimi odgovorni za taj mehanizam su ERM metiltransferaze. Modifikacija uključuje post-transkripcijsku dimetilaciju domene V i mutacije u domenama II i V, zbog čega je onemogućeno vezanje makrolida na bakterijski receptor. Treći, ujedno i najrjeđi mehanizam je deaktivacija makrolida kao posljedica djelovanja enzima koji selektivno vežu i modificiraju strukturu makrolida. Modifikacija se postiže glikozilacijom (mgt glikoziltransferaze), fosforilacijom (*mph A, B i K* fosfotransferaze) ili otvaranjem prstena (*ere A i B* esteraze).<sup>10-12</sup> Sljedeći mehanizam bakterijske rezistencije temelji se na zaštiti ribosoma pomoću proteina ABC-F (engl. *ATP-binding cassette F*).<sup>13,14</sup> Za rezistenciju na makrolide, ketolide i streptogramin B odgovorna je podvrsta Msr proteina ABC-F koja uklanja lijek iz tunela za izlazak novonastalih peptida. Posljednji poznati mehanizam predstavlja stvaranje biofilмова sastavljenih od nakupina mikroorganizama kao „lažnih“ meta na površini bakterijskih stanica, što može rezultirati rezistencijom i na makrolide i na imunološki odgovor domaćina.<sup>15,16</sup>

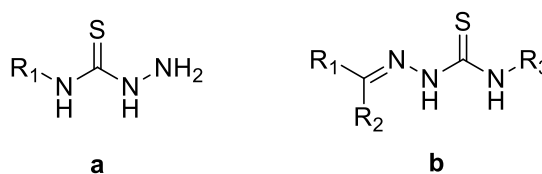
## 2.4. Makrozoni

Pojava bakterijske rezistencije uzrokovala je brojne probleme u primjeni antibiotika i rizike za ljudsko zdravlje. Stoga se krenulo u dizajniranje novih biološki aktivnih tvari s poboljšanim svojstvima i slabijim nuspojavama. Tako su povezivanjem azitromicina i bioaktivnih derivata tiosemikarbazona pripremljeni novi konjugati makrozoni, aktivni i na rezistentne bakterijske sojeve.<sup>17</sup>

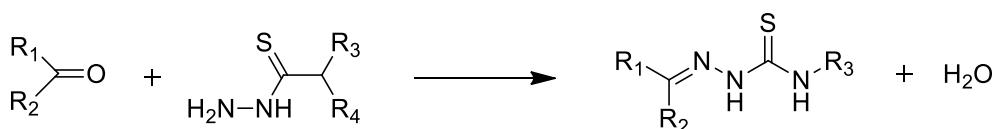
### 2.4.1. Tiosemikarbazoni

Kod dizajna lijekova velike molekulske mase obično se povezuje više manjih biološki aktivnih molekula. Tako se kod sinteze makrozona kao bočni lanac koriste tiosemikarbazoni sa širokim spektrom biološke aktivnosti, poput antitumorske, antrivirusne i antimikrobne. Iako su pokazali dobar potencijal za liječenje mnogih bolesti, još uvijek su u procesu istraživanja i razvoja, a pogotovo se istražuje njihova antitumorska aktivnost.<sup>18</sup>

Opća formula tiosemikarbazona je  $R_1R_2C=N-NH-(C=S)-NR_3R$ . Riječ je o organosumporovim spojevima koji pripadaju skupini derivata tiouree. Karakterističan način dobivanja je kondenzacija tiosemikarbazida sa odgovarajućim aldehidom ili ketonom. Ovisno o supstituentima na početnom aldehidu ili ketonu, mijenjaju se i svojstva tiosemikarbazona te mogući način koordinacije.<sup>17</sup>



Slika 7. Opće strukturne formule a) tiosemikarbazida i b) tiosemikarbazona.



Slika 8. Shematski prikaz dobivanja tiosemikarbazona iz tiosemikarbazida i aldehida/ketona.

Tiosemikarbazoni mogu djelovati samostalno, kao slobodni ligandi ili biti u stabilnom kompleksu s metalom. Zbog dobrih donorskih svojstava atoma dušika i sumpora, može doći do koordinacije s metalnim kationima čime nastaju stabilni kompleksi. Koordinacija, kao i koordinacijski potencijal ovise i o početnim aldehidima ili ketonima, odnosno njihovim supstituentima. Tiosemikarbazoni čine stabilne komplekse s većinom prijelaznih metala, a često je biološka aktivnost upravo posljedica koordinacije na metalni centar.<sup>19</sup>

Neke od primjena tiosemikarbazona su spektrofluorimetrijsko određivanje metala<sup>18</sup>, određivanje i separacija metala u tragovima u realnim i sintetskim smjesama<sup>19</sup> te korištenje tiosemikarbazona kao kemijskih senzora.<sup>18</sup>

#### 2.4.2. Interakcije makrozona i ribosoma

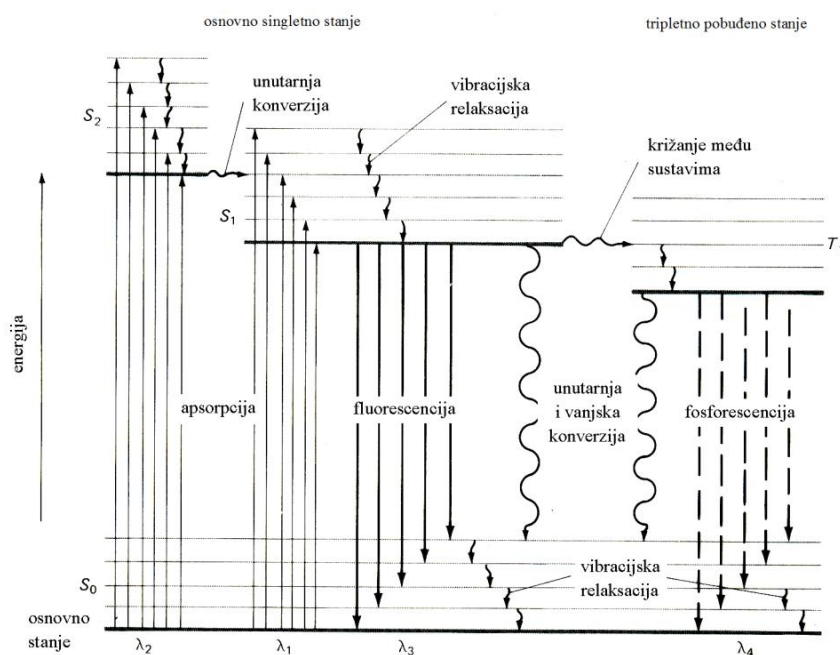
Vežanje i interakcije makrozona s ribosomom slične su kao i kod makrolida, samo što se makrozoni vežu na 23S RNA s više strana. Makrolaktonski prsten veže se na isti način kao i kod makrolida, no prisutne su i dodatne van der Waalsove interakcije i vodikove veze. Dodatne vodikove veze ostvaruju se između tiosemikarbazonkog lanca i nukleotida G2505, U2584, U2506, C2610 i A2503, a samim time povećavaju potencijal vezanja na ribosom u odnosu na eritromicin.

## 2.5. Spektrofluorimetrijske metode

### 2.5.1. Fluorescencija

Spektrofluorimetrijske metode temelje se na procesu fluorescencije kojim se molekula pobuđena apsorpcijom zračenja vraća u osnovno stanje uz emisiju zračenja veće valne duljine od pobudnog zračenja. Proces fluorescencije se može prikazati pomoću dijagrama Jablonskog (slika 9). Osnovno i pobuđeno elektronsko stanje označeni su kao  $S_0$  i  $S_1$ , a svako elektronsko stanje čine osnovno i pobuđena vibracijska stanja. Prijelazi između različitih stanja prikazani su vertikalnim linijama, i usmjereni ovisno radi li se o apsorpciji (strelica gore) ili emisiji (strelica dolje). Tijekom apsorpcije fluorofor se pobudi u neko od viših vibracijskih stanja pobuđenog elektronskog stanja ( $S_1$ ), nakon čega dolazi do unutarnje konverzije. Riječ je o brzom relaksaciji ( $10^{-12}$  s) molekule u osnovno vibracijsko stanje elektronskog stanja  $S_1$  što je

neradijativan proces, bez emisije fotona. U singletnom pobuđenom elektronskom stanju ( $S_1$ ), elektron suprotne orijentacije je u pobuđenoj orbitali sparen s elektronom u orbitali osnovnog elektronskog stanja. Prijelaz iz pobuđenog elektronskog u osnovno elektronsko stanje je spinski dopušten uz emisiju fotona. Proces je brz te traje svega  $\approx 10$  ns, a sama emisija obično iznosi približno  $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ . Fluorescencijski spektar se prikazuje kao emisijski spektar u kojem intenzitet i valna duljina ovise o kemijskoj strukturi fluorofora i korištenom otapalu.<sup>20,21</sup>



Slika 9. Dijagram Jablonskog.<sup>20</sup>

Iako sve molekule koje apsorbiraju zračenje mogu fluorescirati, većina ih ne fluorescira jer njihova struktura omogućuje relaksaciju bez otpuštanja zračenja bržu od fluorescencijske emisije. Stoga najveći intenzitet fluorescencije imaju aromatski spojevi krute strukture. Kod bioloških makromolekula, fluorescenciji najviše doprinose aromatski bočni lanci aminokiselina i nukleotidi.<sup>22,23</sup> Spektrofluorimetrijske metode odlikuju se 10–1000 puta većom osjetljivošću od apsorpcijskih metoda. S obzirom da se fluorescentna vrsta određuje pomoću dva parametra, valne duljine pobude i valne duljine emisije, znatno je veća i selektivnost. Odabirom valne duljine pobude, različiti spojevi u uzorku se mogu određivati zasebno.

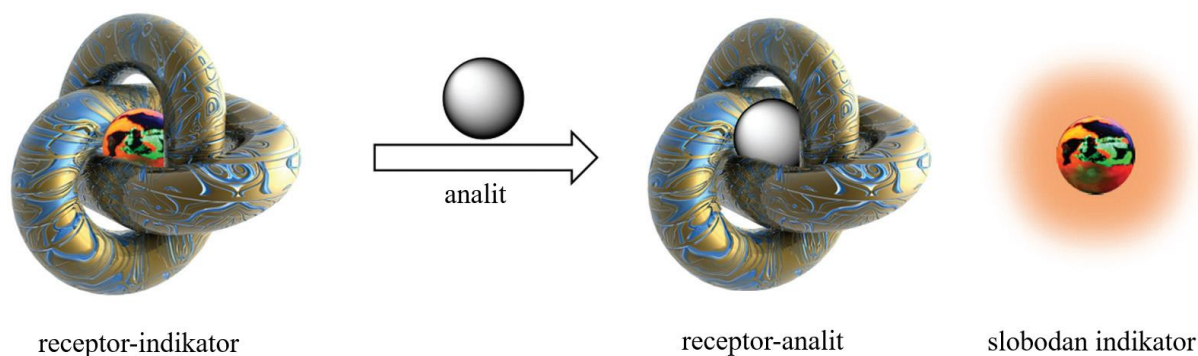
### 2.5.2. Primjena fluorescencijske spektroskopije

Da bi se odredila i poboljšala bioaktivnost makrolida potrebno je identificirati aktivno mjesto makrolida te način i mjesto vezanja na ribosom. Fluorescencijska spektroskopija brza je i jednostavna metoda za određivanje mjesta i konstante vezanja makrolida te procjenu utjecaja vezanja na strukturu i biološku funkciju molekule lijeka. Priprema uzoraka podrazumijeva označavanje molekule lijeka ili ribosoma fluoresceirajućim spojem. Neki od fluoresceirajućih supstituenata su BODIPY i NBD te oni veći, poput rodamina i fluoresceina. Primjena velikih supstituenata ograničena je zbog smanjenja afiniteta vezanja lijeka te je stoga upotreba manjih supstituenata raširenija. Nedostatak ove metode predstavlja zahtjevnost procesa selektivnog označavanja fluoroforom, ali i mogući utjecaj na biološku aktivnost i način vezanja lijeka.<sup>24,25</sup>

### 2.5.3. Spektrofluorimetrija uz kompetitor

Mnoge molekule nemaju sposobnost fluorescencije ili im je spektroskopski odziv slab pa se za takve spojeve koriste fluoresceirajući spojevi kao kompetitori. Fluorimetrijska analiza s kompetitorom (engl. *indicator displacement assay*, IDA) je metoda koja se temelji na reverzibilnom vezanju fluoresceirajućeg indikatora na molekulu domaćina, odnosno receptor. Kada se u sustavu pojavi molekula analita, dolazi do zamjene molekule indikatora molekulom analita, odnosno vezanja analita na domaćina. Rezultat vezanja je promjena u optičkom signalu koja se može pratiti spektrofotometrijski ili fluorimetrijski.

Kao indikatori se obično koriste kolorimetrijske ili fluorescentne vrste kojima je poznat pobudni i emisijski profil. Da bi metoda bila uspješna, potrebno je poznavati svojstva indikatora kao što su naboj, hidrofobnost, veličina, kako bi se postiglo komplementarno vezanje za molekulu domaćina. Pritom je važno i da željeni analit ima veći afinitet vezanja za domaćina pri nekoj koncentraciji od samog indikatora, tako da može doći do uspješne zamjene i promjene intenziteta fluorescencije.<sup>26,27</sup>



Slika 10. Shematski prikaz fluorimetrijske analize s kompetitorom (IDA). Dodatkom analita dolazi do njegovog vezanja na receptor i otpuštanja slobodnog indikatora.<sup>27</sup>

Brandt-Rauf i suradnici izveli su kompeticijske eksperimente u kojima su koristili fluorescentno obilježen eritromicin kao kompetitor (F-eri) u svrhu određivanja vezanja eritromicina i njegovih derivata na ribosom. Na taj način uočili su da se derivati eritromicina mogu podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu spojeva čine derivati koji mogu u potpunosti istisnuti kompetitor iz veznog mjesta ribosoma i vratiti intenzitet fluorescencije na početnu vrijednost. Kod takvih spojeva nedvojbeno se može odrediti konstanta vezanja na ribosom. Druga skupina spojeva predstavlja derivate koji ne mogu u potpunosti istisnuti F-eritromicin iz kompleksa F-eritromicin-ribosom. Kod takvih spojeva intenzitet fluorescencije ne vraća se na početnu vrijednost i konstanta vezanja može se odrediti sa znatno manjom sigurnošću. Na kraju su zaključili da stupanj kompeticije spojeva s F-eritromicinom na ribosomu može ukazivati na njihovu sposobnost interakcije s veznim mjestom za eritromicin na ribosomu.<sup>28</sup>

#### 2.5.4. Gašenje flouescencije

Gašenje flouescencije zajednički je naziv za sve procese u kojima dolazi do smanjenja intenziteta flouescencije u uzorku. Može biti posljedica raznih molekulskih interakcija, poput reakcija u pobuđenom stanju, pregrađivanja, formiranja kompleksa u osnovnom stanju i kolizijskog gašenja. Dinamičko (kolizijsko) i statičko gašenje podrazumijevaju interakcije između fluorofora i reagensa koji uzrokuje gašenje. Kod dinamičkog gašenja dolazi do difuzije reagensa do fluorofora tijekom vremena poluživota pobuđenog stanja. Kada dođe do kontakta reagensa i fluorofora, fluorofor se vraća u osnovno stanje, ali bez emisije fotona. Drugim riječima, ne dolazi do fotokemijske reakcije. Statičko gašenje podrazumijeva



interakciju fluorofora i reagensa pri čemu nastaje nefluoresceirajući kompleks. Fenomen gašenja ima široku primjenu, a jedna od njih je proučavanje mehanizama biomolekulskih interakcija. Metodom gašenja fluorescencije je stoga moguće dobiti informacije o dostupnosti fluorofora reagensu, njihovu jačinu vezanja te lokalizaciji fluorofora u proteinu ili staničnoj membrani.<sup>29,30</sup>

Gašenje je opisano Stern-Volmerovom jednačom:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

$$k_q = K_{sv}/\tau_0$$

gdje  $F_0$  i  $F$  predstavljaju intenzitet fluorescencije fluorofora prije i nakon dodatka reagensa.  $K_{sv}$  je Stern-Volmerova konstanta gašenja,  $k_q$  je bimolekularna konstanta gašenja, a  $[Q]$  predstavlja koncentraciju reagensa. Pristupačnost reagensa fluoroforu opisana je bimolekularnom konstantom  $k_q$ . Ukoliko se radi o dinamičkom gašenju, vrijednosti  $k_q$  ne bi trebale prelaziti vrijednost  $2 \cdot 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a vrijednost veća od navedene sugerira na vezne interakcije između reagensa i fluorofora.<sup>31</sup>

Wani i suradnici proveli su fluorimetrijska mjerenja kako bi odredili interakcije vezanja antibiotika kolhicina i azitromicina na protein BSA. Odredili su da vezanjem kolhicina na BSA dolazi do gašenja fluorescencije, dok azitromicin nije izazvao gašenje. Zaključili da veća koncentracija kolhicina potiče jače gašenje. Za interakcije kolhicina i BSA dobivena je vrijednost  $k_q$  veća od  $2 \cdot 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  što ukazuje na formiranje kompleksa između antibiotika i BSA, dok kod azitromicina nije došlo do interakcija. Konstanta  $K_{sv}$  pomaže kod određivanja mehanizma gašenja u interakciji proteina s ligandom. Za kompleks BSA-kolhicin određeno je da se radi o statičkom gašenju. Međutim, pri višim temperaturama, vrijednosti  $K_{sv}$  su se smanjile što ukazuje na nastanak nestabilnog kompleksa.<sup>31</sup>

## 2.6. Ostale metode za određivanje strukture i interakcija makrolida

Dizajn novih i učinkovitih makrolida aktivnih na rezistentne bakterijske sojeve jedan je od najvećih izazova suvremene medicinske kemije. Za planiranje dizajna potrebno je poznavati cjelokupni biološki profil makrolida koji podrazumijeva interakcije makrolida s biološkim metama. Za takav pristup potrebno je optimirati farmakokinetički profil bioaktivnih spojeva povećanjem njihove topljivosti, bioraspoloživosti, raspodjele i ekskrecije. Stoga točno

određivanje mjesta vezanja i mehanizma djelovanja može pomoći u poboljšanju fizikalno-kemijskih svojstava potencijalnih lijekova.<sup>32</sup>

### 2.6.1. Interakcije s biološkim metama

Biološki aktivni makrolidi vežu se na bakterijski ribosom, a mehanizam vezanja ovisi o strukturi makrolida i vrsti bakterije. Za razumijevanje mehanizma djelovanja makrolida potrebno je odrediti načine interakcija makrolida i njihovih derivata s ribosomom te je važno odrediti konformaciju molekula lijeka u otopini. Već dugi niz godina većina istraživanja usmjerena je prema analizi kompleksa makrolida i ribosoma.<sup>33</sup>

Najviše korišten pristup obuhvaća metode spektroskopije NMR i molekularnog modeliranja čime se proučavaju konformacijske promjene slobodnih i vezanih makrolida. Poznato je da makrolaktonski prsten u otopini može postojati u dvije konformacije, uvrnutoj (engl. *folded-in*) ili izvrnutoj (engl. *folded-out*), ovisno o međusobnom položaju skupina u prstenu.<sup>5</sup> Kod uvrnute konformacije mogu se uočiti bliski kontakti između atoma H3 i H11 (C3 i C11) te metilne skupine u položaju 6 s atomima H4 i C4. S druge strane, izvrnutu konformaciju karakterizira bliski kontakt atoma u položaju 4 s atomima H11 i C11, dok se H5 i C5 nalaze u blizini metilne skupine u položaju 6.<sup>34-37</sup>

Eksperimentalni uvjeti, poput temperature i polarnosti otapala, utječu na postotak zastupljenosti pojedinog konformera.<sup>17</sup> Kod petnaesteročlanih makrolida uočena je i treća moguća konformacija, *3-endo-folded-out*, koja ujedinjuje strukturne značajke obje konformacije.<sup>33</sup>

Najčešće korištene tehnike NMR temelje se na NOE prijenosu magnetizacije, a to su tehnika razlike prijenosa zasićenja (engl. *saturation transfer difference*, STD) i spektroskopija prijenosnog nuklearnog Overhauserovog efekta (engl. *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*, trNOESY). Tehnika STD koristi se za identifikaciju vezanih epitopa liganda, a trNOESY omogućava detaljno određivanje slobodnih i vezanih konformacija liganda. Obje tehnike su brze i robusne te daju informacije o molekularnoj strukturi i interakcijama s bakterijskim ribosomom.<sup>17,32</sup>

### 2.6.2. Interakcije makrolida s proteinima iz plazme

Bioraspoloživost je jedno od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava lijekova. S obzirom da bioraspoloživost ovisi o načinu vezanja lijeka na proteine iz plazme, ovo svojstvo se može procijeniti iz podataka o interakcijama antibiotika i albumina. Albumini su važni transportni proteini na koje se reverzibilno vežu molekule makrolida. Zbog svoje homologne strukture, albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) najčešće je korišten modelni protein za proučavanje interakcija s ligandima koji se prenose kroz plazmu.<sup>32,33</sup>

Novak i suradnici koristili su tehniku STD NMR za istraživanje interakcija makrolida s BSA.<sup>33</sup> U svom istraživanju odredili su vezne epitope za azitromicin, oleandomicin i telitromicin. Ustanovili su da azitromicin i oleandomicin pokazuju sličan način vezanja i vezni epitopi, dok je za telitromicin ustanovljen različit način vezanja. Razlika u vezanju vjerojatno proizlazi iz strukture proučavanih makrolida. Protoni desozamina u azitromicinu i oleandomicinu u bliskom su kontaktu s albuminom, dok su kod telitromicina nešto udaljeniji.

### 2.6.3. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (CD) je vrsta apsorpcijske spektroskopije kod koje se mjeri razlika u apsorpciji lijevo ili desno polariziranog svjetla. Optički aktivne kiralne molekule preferirano apsorbiraju jedan smjer cirkularno polariziranog zračenja. Najraširenija primjena ove metode je određivanje strukture proteina i DNA. Peptidne veze u proteinima su optički aktivne pa se stoga eliptičnost koju uzrokuju mijenja ovisno o lokalnim konformacijama molekule. Moguće je proučavati i konformacijske promjene u RNA koje se događaju vezanjem molekula antibiotika. Nadalje, proteini koji sadrže metale mogu biti vidljivi u spektru CD. U kiralnom okruženju, polarizirano vidljivo zračenje pobuđuje *d-d* prijelaze u metalima, dok ga slobodni ioni u otopini ne apsorbiraju, što omogućuje određivanje ovisnosti o pH i stehiometriju vezanja metala.<sup>38</sup>

Adler i suradnici koristili su metodu CD za praćenje promjena u strukturi ribosoma nastalih uslijed termičke denaturacije i uklanjanja metala, te renaturacije hlađenjem i dodatkom metala. Primjenom metode CD dobili su informacije o odnosu između sličnih kromofora unutar konglomerata ribosoma te su dobili uvid u rast čestica tijekom taloženja. Uz to, dobivene su i informacije o malim lokalnim promjenama u strukturi RNA. Utvrđeno je da

promjene u koncentraciji iona magnezija utječu na spektar CD što može ukazivati na promjene konformacije rRNA kao posljedicu promjene okoline.<sup>39,40</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Sve otopine pripravljene su u kakodilatnom puferu ionske jakosti  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ . Pufer je pripremljen iz otopine A koja je sadržavala 138 mg kakodilne (dimetilarsinske) kiseline u 5 mL redestilirane vode. Zatim je uzet alikvot od 250  $\mu\text{L}$  otopine A i dodan je 1 mL redestilirane vode. Vrijednost  $\text{pH}$  otopine podešana je na 7,00 uz dodatak otopine natrijeva hidroksida te je tikvica nadopunjena redestiliranom vodom do 10 mL. Parametri kalibracije  $\text{pH}$  metra navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Parametri kalibracije  $\text{pH}$  metra izvedeni pri 25 °C.

<b>pH</b>	<b>EMF / mV</b>
4,01	184,4
7,00	9,0
10,01	-154,8

Provedena su fluorimetrijska, UV-Vis i CD mjerenja. Za eksperimente su korištene ishodne otopine makrozona **1** ( $c_0 = 4,96 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), **2** ( $c_0 = 5,38 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) i 9a-NBD-azi ( $c_0 = 1,49 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) u DMSO. Korištene su i otopine BSA ( $c_0 = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), 70S ribosoma iz bakterije *Escherichia coli* ( $c_0 = 7,40 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) te receptori ctDNA (engl. *calf thymus* DNA,  $c_0 = 2,21 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) i pApU (poli adenin-poli uracil RNA, koncentracije  $2,93 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 3.1.1. Mjerenja UV-Vis

Mjerenja UV-Vis provedena su na spektrofotometru *Varian Cary 100 Bio* u kvarcnoj kivetici s optičkim putem od 1,00 cm.

Prvi korak bio je snimanje slijepe probe, kakodilatnog pufera ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ). Otopine makrozona **1** pripravljene su razrjeđivanjem ishodne otopine kakodilatnim puferom sljedećih koncentracija:  $4,96 \cdot 10^{-6}$ ;  $9,92 \cdot 10^{-6}$ ;  $1,48 \cdot 10^{-5}$  i  $1,98 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Na isti

način pripravljene su i otopine koncentracija  $5,38 \cdot 10^{-6}$ ;  $1,08 \cdot 10^{-5}$ ;  $1,61 \cdot 10^{-5}$  i  $2,15 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> za makrozon **2**. Podaci su obrađeni i izračunat je molarni apsorpcijski koeficijent.

U svrhu određivanja temperature mekšanja ctDNA, promjena apsorpcije kao funkcija temperature praćena je pri 260 nm u temperaturnom raponu od 25 do 95 °C. Snimljeni su spektri čiste otopine ctDNA ( $c = 2,21 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) u kakodilatnom puferu otopine ctDNA u koju je dodan makrozon **1** ( $c_0 = 4,96 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). Isti postupak ponovljen je i za makrozon **2** ( $c_0 = 5,38 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). Svako mjerenje ponovljeno je dva puta.

Isti je eksperiment proveden i za određivanje temperature mekšanja RNA, odnosno pApU. Otopina polinukleotida pApU ( $c = 5,00 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) pripravljena je u kakodilatnom puferu te su snimljeni apsorpcijski spektri otopine i čistog pufera. Zatim je otopini dodan makrozon **1** ( $c_0 = 4,96 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) i snimljen je spektar dobivene smjese. Isto je ponovljeno za makrozon **2** ( $c = 5,38 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>).

Derivacijom temperature u točki infleksije, iz grafičkog prikaza ovisnosti promjene apsorpcije o temperaturi, dobivena je temperatura mekšanja. Vrijednosti  $\Delta t_m$  dobivene su oduzimanjem vrijednosti  $t_m$  slobodne nukleinske kiseline od vrijednosti  $t_m$  kompleksa nukleinske kiseline s makrozonom. Sva mjerenja provedena su dva puta te je stoga vrijednost  $\Delta t_m$  srednja vrijednost dvaju mjerenja.

Spektri UV-Vis snimljeni su i radi određivanja molarnog apsorpcijskog koeficijenta spoja **3** u kakodilatnom puferu. Mjerenja su provedena na spektrofotometru *Agilent Cary 60* u kvarcnoj kiveti s optičkim putem od 1,00 cm. Apсорpcijski spektri snimani su u rasponu valnih duljina od 240 do 500 nm. Maksimalna apsorpcija izmjerena je pri 320 nm. Najprije je snimljen spektar bazne linije, odnosno kakodilatnog pufera ( $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>, pH = 7). Nakon toga dodana je otopina makrozona **3** ( $c_0 = 1,706 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), tako da su konačne koncentracije iznosile  $1,00 \cdot 10^{-5}$  i  $2,00 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Podaci su obrađeni i izračunat je molarni apsorpcijski koeficijent.

Apsorpcijski spektar snimljen je i za otopinu kompleksa 9a-NBD-azitromicina sa spojem **3**, na istom instrumentu i pri istim uvjetima mjerenja. Prvo je snimljen spektar kakodilatnog pufera ( $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>, pH = 7), a zatim je dodana otopina kompleksa 9a-NBD-azi sa spojem **3** koncentracije  $2,10 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Zbog prejake apsorpcije, otopina je razrijeđena do koncentracije  $1,12 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

### 3.1.2. Fluorimetrijska mjerenja

Fluorimetrijska mjerenja izvedena su na spektrofluorimetrima *Edinburgh Instruments FS5* i *Varian Cary Eclipse* pri sobnoj temperaturi u kvarčnoj kiveti s optičkim putem od 1,00 cm.

Za proučavanje interakcija makrozona s BSA provedeni su titracijski eksperimenti BSA s makrozonima **2** i **3**. Fluorescencijski spektri snimani su u rasponu valnih duljina od 320 do 400 nm uz valnu duljinu pobude pri 280 nm. Maksimalan intenzitet emisije izmjeren je pri valnoj duljini od 320 nm. Širina pobudne pukotine iznosila je 5 nm, a emisijske 10 nm.

Prije dodatka uzorka, snimljeni su spektri slijepe probe, odnosno čistog kakodilatnog pufera te spektar BSA ( $5,00 \cdot 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) prije dodatka makrozona. Nakon toga uslijedila je titracija proteina s makrozonom uz vrijeme inkubacije od 1 min kako bi se postigla ravnoteža u reakcijskoj smjesi. Titracija makrozonom izvodila se do izostanka vidljive promjene relativnog intenziteta fluorescencije. Podaci su zatim multivarijatno analizirani u programu *HypSpec 2014* kako bi se izračunala konstanta vezanja uz korištenje metodologije IDA.

U svrhu određivanja vezanja ribosoma na fluorescentni derivat azitromicina, te kasniju mogućnost usporedbe vezanjem na makrozon, proveden je titracijski eksperiment spoja 9a-NBD-azi sa ribosomom. Fluorescencijski spektri snimani su u rasponu valnih duljina od 500 do 700 nm uz pobudu pri 475 nm. Maksimalan intenzitet emisije izmjeren je pri 535 nm. Širina pobudne pukotine iznosila je 5 nm, a emisijske pukotine 10 nm.

Za proučavanje interakcija makrozona **1** s ribosomom iz bakterije *E. coli* provedeni su kompeticijski eksperimenti u kojima je korišten fluorescentni derivat azitromicina, 9a-NBD-azi. Fluorescencijski spektri snimani su u rasponu valnih duljina od 485 do 700 nm s valnom duljinom maksimalne pobude pri 475 nm, a maksimalni intenzitet emisije izmjeren je pri 535 nm. Širina pobudne pukotine iznosila je 5 nm, a emisijske 10 nm.

Pripravljena je ishodna otopina spoja 9a-NBD-azi u DMSO množinske koncentracije  $5,31 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Ishodna otopina je zatim razrijeđena kakodilatnim puferom ( $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>, pH = 7) do koncentracije  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Koncentracije ishodnih otopina makrozona **1–3** u DMSO bile su  $4,96 \cdot 10^{-3}$ ,  $5,38 \cdot 10^{-3}$ , odnosno  $1,71 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Nakon snimanja bazne linije, uslijedila je titracija 9a-NBD-azi spoja s ribosomom iz bakterije *E. coli*, koncentracije  $15,3 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Titracija se izvodila do zasićenja, odnosno do promjene relativnog intenziteta fluorescencije za više od 10%. Tada se u istu otopinu počela dodavati otopina makrozona te se ponovno pratila promjena relativnog intenziteta fluorescencije. Za svaki

dodatak ribosoma ili makrozona u reakcijsku smjesu, inkubacija je trajala 1 min radi postizanja ravnoteže u reakcijskoj smjesi. Dobiveni tablični podaci su multivarijatno analizirani u programu *HypSpec 2014* za izračun konstante vezanja koristeći metodologiju IDA.

Za spoj **3** snimani su i fluorescencijski spektri bez dodatka ribosoma. Uvjeti mjerenja bili su isti kao i kod kompeticijskih eksperimenata za isti spoj. Prvo se snimio spektar slijepa probe, a zatim spektar 9a-NBD-azitromicina ( $c_0 = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Nakon toga uslijedila je titracija otopine 9a-NBD-azitromicina makrozonom **3**. Titracija se provodila do zasićenja, odnosno do kada više nije dolazilo do značajne promjene intenziteta fluorescencije. Dobiveni podaci su multivarijatno analizirani u programu *HypSpec 2014* za izračun konstante vezanja koristeći metodologiju IDA.

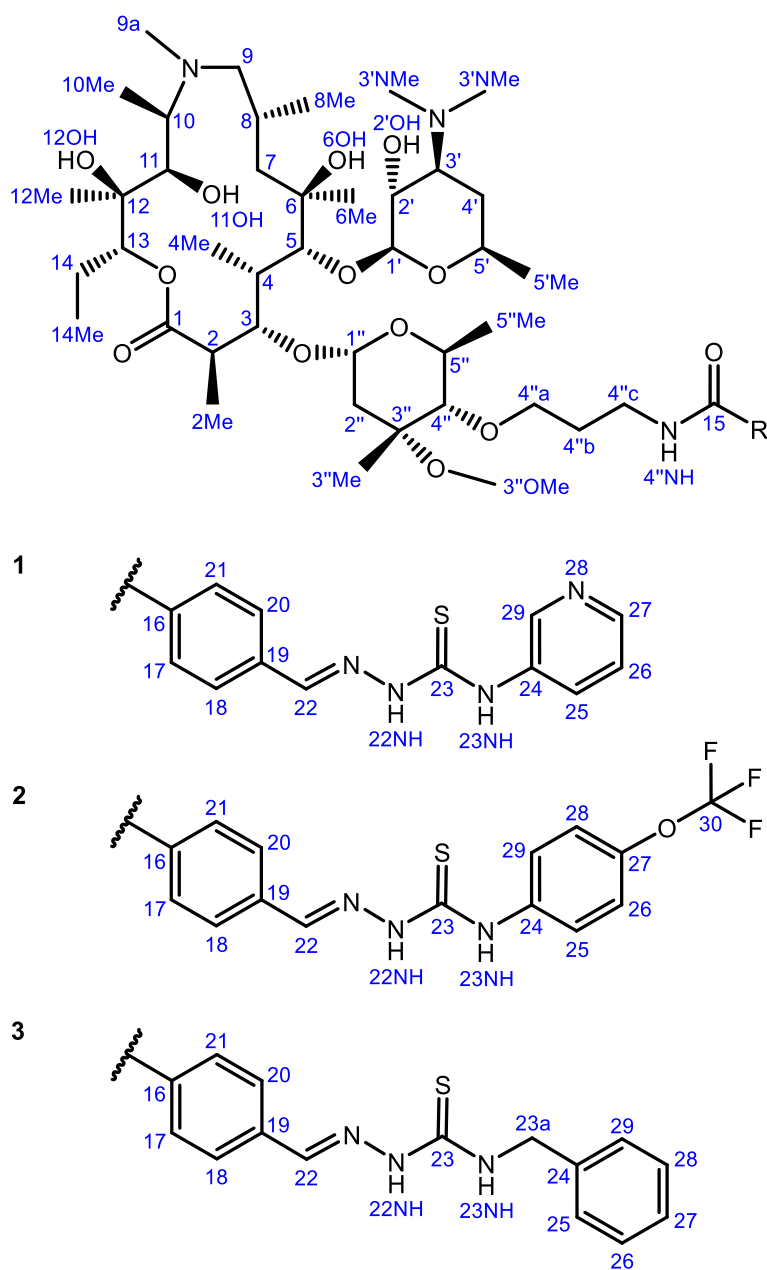
### 3.1.3. Cirkularni dikroizam

Eksperimenti CD provedeni su na JASCO J-815 CD spektrometru pri sobnoj temperaturi u kivetu s duljinom optičkog puta od 1,00 cm. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 220 do 400 nm. Brzina snimanja iznosila je  $200 \text{ nm min}^{-1}$ , a osjetljivost je podešena na 5 mdeg. Prvo je snimljena slijepa proba, odnosno spektar kakodilatnog pufera. Uslijedilo je snimanje makrozona **1** ( $c = 1,97 \cdot 10^{-5}$  i  $5,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) i **2** ( $c = 1,98 \cdot 10^{-5}$ ;  $3,95 \cdot 10^{-5}$  i  $5,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) te titracijski eksperimenti s DNA, RNA, BSA i ribosomom.



## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

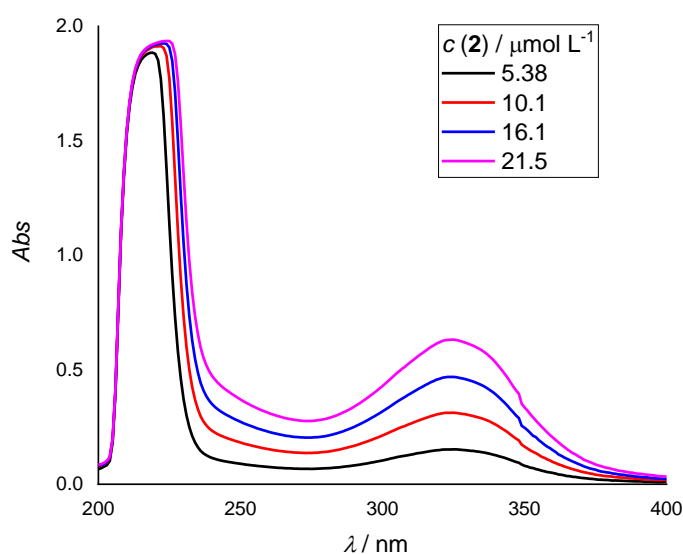
Ključan korak u pronalasku novih antibiotika aktivnih na rezistentne bakterijske sojeve je razumijevanje načina interakcija makrolida s biološkim metama.<sup>41</sup> Cilj ovog rada bio je odrediti konstante vezanja nekoliko 4"-aril-makrozona na njihove biološke mete, uz naglasak na interakcije s ribosomom iz bakterije *E. coli*. Ostale biološke mete obuhvaćene ovim radom su ctDNA, RNA (pApU) i protein BSA. Za istraživanja su odabrani 4"-piridin-3-il- (**1**), 4"-(4-trifluormetoksifenil)- (**2**) te 4"-benzil- (**3**) makrozoni, čije su strukture prikazane na slici 11. Razlog odabira navedenih makrozona je postojanje više aromatskih skupina u strukturi, što može rezultirati promjenom apsorbancije ili intenziteta fluorescencije uslijed interakcije s drugom molekulom ili biološkom metom. Odabrani makrozoni odlikuju se aktivnošću na *E. coli*. Problem koji se javio u vezi makrozona **1–3** je slaba topljivost u vodi koja ograničava moguće načine istraživanja, tako da su za ovo istraživanje otopine makrozona pripravljene otapanjem u DMSO, a kasnije su razrijeđene kakodilatnim puferom ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-3}$ , pH = 7). Za navedena istraživanja primijenjene su spektrofotometrijske, spektrofluorimetrijske i CD metode.



Slika 11. Strukture analiziranih makrozona s brojanjem atoma: **1)** 4''-piridin-3-il- makrozon, **2)** 4''-(4-trifluormetoksifenil)- makrozon, **3)** 4''-benzil- makrozon.

#### 4.1. Spektrofotometrijska mjerenja

Preeliminarna istraživanja obuhvatila su spektrofotometrijska mjerenja kako bi se odredila valna duljina maksimalne apsorpcije i vrijednosti molarne apsorptivnosti (slika 12). Pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije od 325 nm u području koncentracija  $5 \cdot 10^{-6}$ –  $2 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, apsorpcija otopine makrozona porasla je proporcionalno koncentraciji što je pokazalo da pri eksperimentalnim uvjetima proučavani spojevi ne agregiraju.<sup>43</sup> Apsorpcijski maksimum i odgovarajući molarni apsorpcijski koeficijenti ( $\epsilon$ ) dani su u tablici 2.

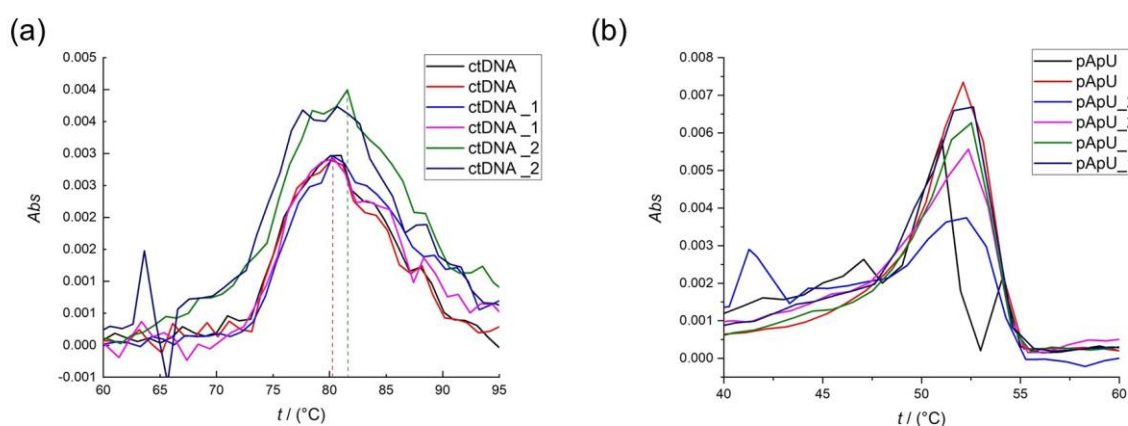


Slika 12. Spektar UV-Vis otopine makrozona 2. Ovisnost apsorpcije o koncentraciji makrozona u kakovitnom puferu ( $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>, pH = 7).

Tablica 2. Vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata makrozona 1–3 ( $\lambda_{\text{maks}} = 325$  nm).

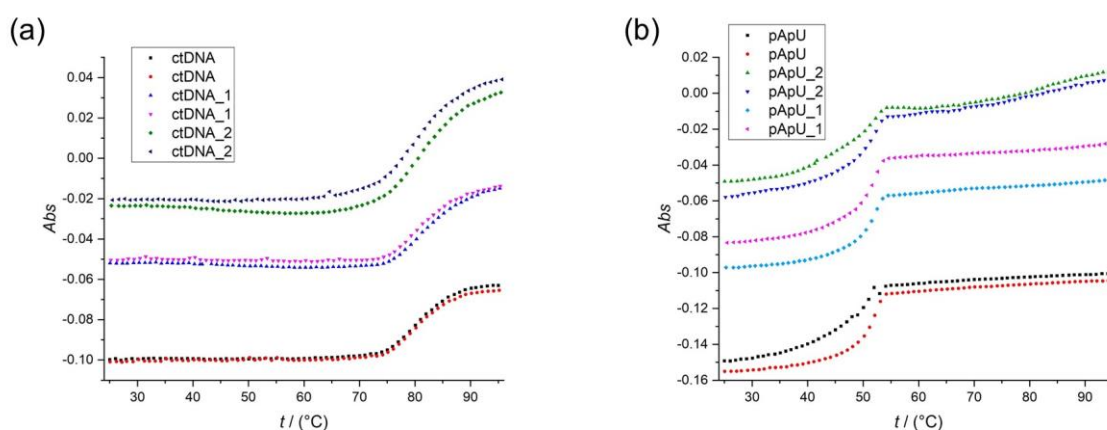
Spoj	$\epsilon / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
1	29 496,05
2	29 711,55
3	34 353,00

Poznato je da pojedini heterociklički lijekovi mogu stupiti u interakciju s bakterijskom DNA i RNA. Rezultat interakcija je blokiranje replikacije i transkripcije DNA ili ometanje enzima za obradu DNA odgovornih za antibakterijsko djelovanje. Temperatura mekšanja može pružiti informacije o stabilizaciji polinukleotida u prisutnosti lijeka.<sup>43</sup> Za određivanje temperature mekšanja polinukleotida ctDNA i RNA (pApU), odnosno disocijacije dvostruke zavojnice te utjecaja dodatka makrozona na temperaturu mekšanja, snimljeni su spektri UV-Vis. Promjena apsorbancije kao funkcija temperature mjerena je pri 260 nm u temperaturnom rasponu 25–95 °C. Grafički prikaz ovisnosti promjene apsorbancije o promjeni temperature prikazan je na slici 13. Temperatura mekšanja dobivena je derivacijom temperature u točki infleksije. Oduzimanjem temperatura mekšanja slobodne nukleinske kiseline i kompleksa nukleinske kiseline s makrozonom izračunate su vrijednosti  $\Delta t_m$ . S obzirom da su mjerenja izvedena dva puta, vrijednost  $\Delta t_m$  određena je kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.



Slika 13. (a) Apsorpcijski spektar polinukleotida ctDNA u ovisnosti o temperaturi (60–95 °C) bez dodatka makrozona i s dodacima makrozona **1** i **2** ( $c_o(\text{ctDNA}) = 2,21 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $c_o(\mathbf{1}) = 4,96 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $c_o(\mathbf{2}) = 5,38 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) za omjer  $r$  ([makrozon] / [polinukleotid]) = 0,3; (b) apsorpcijski spektar polinukleotida pApU u ovisnosti o temperaturi bez dodatka makrozona i s dodacima makrozona **1** i **2** ( $c_o(\text{pApU}) = 5,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $c_o(\mathbf{1}) = 4,96 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $c_o(\mathbf{2}) = 5,38 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) za omjer  $r$  ([makrozon] / [polinukleotid]) = 0,3.

Za polinukleotid ctDNA dobivena je vrijednost temperature mekšanja  $80,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iz grafa na slici 13.a može se uočiti da je dodatkom makrozona **2** došlo do blagog pomaka temperature mekšanja na  $81,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dok dodatkom makrozona **1** nije došlo do nikakve promjene. Izračunata vrijednost  $\Delta t_m$  za makrozon **2** stoga iznosi  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za polinukleotid pApU određena je vrijednost temperature mekšanja  $52,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a dodatkom makrozona nije došlo do značajnije promjene iz čega bi se moglo zaključiti da dodatak makrozona ne utječe na stabilizaciju RNA zavojnice. Međutim, iz slike 14.b za makrozon **2** vidi se blagi porast apsorbancije na otprilike  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  što bi moglo upućivati na ponovnu stabilizaciju pri toj temperaturi.



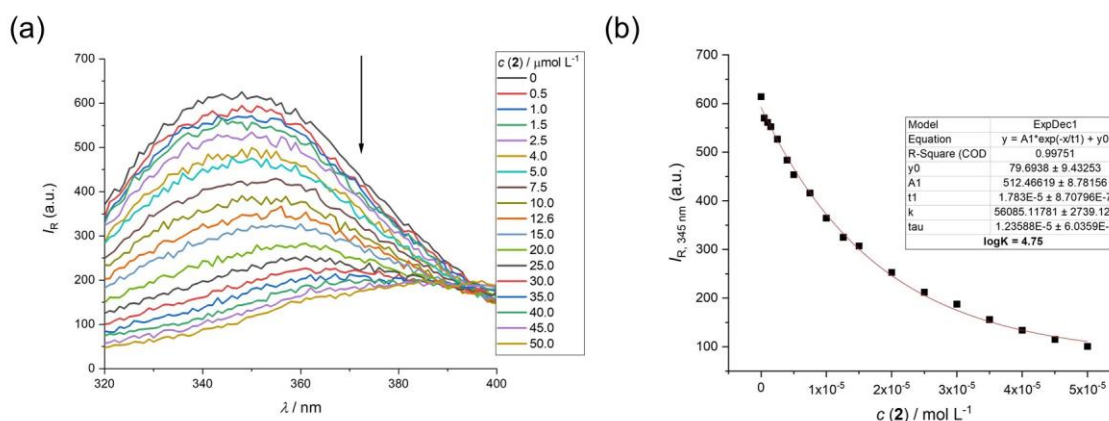
Slika 14. (a) Krivulje taljenja ctDNA ( $c_o(\text{ctDNA}) = 2,21 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ ) uslijed dodatka spojeva **1** i **2** ( $c_o(\mathbf{1}) = 4,96 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ ,  $c_o(\mathbf{2}) = 5,38 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ ) u omjeru  $r$  ([makrozon] / [polinukleotid]) = 0,3 u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05\text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri temperaturama 25–95 °C, (b) krivulje taljenja pApU ( $c_o(\text{pApU}) = 5,00 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ ) uslijed dodatka spojeva **1** i **2** ( $c_o(\mathbf{1}) = 4,96 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ ,  $c_o(\mathbf{2}) = 5,38 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ ) za omjer  $r$  ([makrozon] / [polinukleotid]) = 0,3 u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05\text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) u temperaturnom rasponu 25–95 °C.

## 4.2. Fluorimetrijska mjerenja

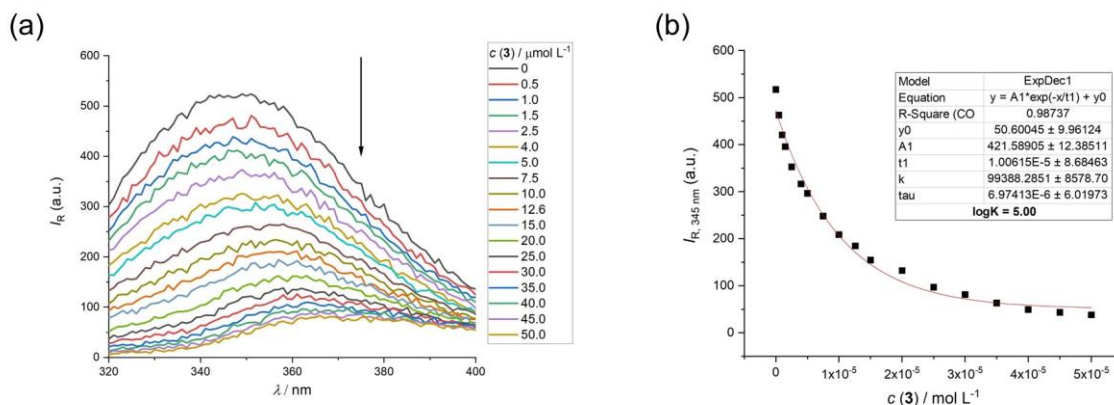
Cilj rada bio je istražiti vezanje makrozona na BSA i ribosom, što zbog slabe topljivosti **1–3** u vodenom mediju nije bilo moguće provesti spektroskopijom NMR. Stoga je u ovom slučaju korištena osjetljivija metoda, spektrofluorimetrijska analiza.

## 4.2.1. Interakcije makrozona s BSA

Najprije su istraživane interakcije makrozona s proteinom BSA. Mjerenja su izvedena pri  $\lambda_{\text{eksc}} = 280 \text{ nm}$  što je dovoljno odmaknuto od područja apsorpcije okosnice BSA. Eksperimenti su provedeni titracijom otopine BSA-9a-NBD-azi uz dodatak makrozona **2** i **3** pri čemu se pratila promjena fluorescencije (slike 15 i 16). Tijekom titracije došlo je do gašenja fluorescencije, a vidljiv je i crveni (batokromni) pomak u emisijskom spektru, odnosno pomak valne duljine maksimalne emisije prema većim vrijednostima što ukazuje na formiranje kompleksa između makrozona i BSA. Nelinearnom regresijom vrijednosti relativnih intenziteta fluorescencije pri 345 nm u ovisnosti o koncentraciji makrozona izračunata je konstanta vezanja makrozona na BSA za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1 (tablica 3).



Slika 15. (a) Fluorescencijski spektar titracije BSA ( $c_0 = 5,00 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) s makrozonom **2** ( $c_0 = 2,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) pri  $\lambda_{\text{eksc}} = 280 \text{ nm}$ , (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\text{maks}} = 345 \text{ nm}$  o množinskoj koncentraciji makrozona **2** u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; nelinearna regresija titracijskih podataka za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1 prikazana je crvenom linijom.



Slika 16. (a) Fluorescencijski spektar titracije BSA ( $c_0 = 5,00 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) s makrozonom **3** ( $c_0 = 1,706 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) pri  $\lambda_{\text{eksc}} = 280 \text{ nm}$ , (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\text{maks}} = 345 \text{ nm}$  o množinskoj koncentraciji makrozona **3** u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; nelinearna regresija titracijskih podataka za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1 prikazana je crvenom linijom.

Analiza fluorimetrijskih podataka izvedena je univarijatno i multivarijatno. Univarijatna analiza podrazumijeva određivanje konstante iz titracijskih krivulja pri određenoj valnoj duljini, dok se multivarijatnim metodama analizira cijelo područje spektra.

Vrijednosti konstante disocijacije izračunate univarijatno i multivarijatno pomoću programa *HypSpec 2014* za sustave makrozon-BSA prikazane su u tablici 3. Unutar programa *HypSpec 2014* moguće je korištenje različitih modela (AB, AB<sub>2</sub>) s različitim stehiometrijama vezanja liganda (B) na receptor (A) te model (ABC) za kompetitivni sustav s kompetitorom (C). Za interakcije unutar sustava makrozon-BSA najbolji rezultati dobiveni su za model AB s konstantom stabilnosti  $K_S$ . Dobivena konstanta vezanja makrozona **2** na BSA iznosila je  $K_S = 9,19 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  ( $\log K = 4,96$ ), što odgovara konstanti disocijacije  $10,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Za makrozon **3** izračunata je konstanta vezanja  $K_S = 6,07 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  ( $\log K = 4,78$ ), što odgovara konstanti disocijacije  $16,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Izračunate konstante vezanja makrozona **2** i **3** na BSA su usporedive, a univarijatnom i multivarijatnom analizom dobiveni su slični podaci. Pouzdaniji su ipak rezultati dobiveni multivarijatnom analizom zato što se konstanta ne izračunava pri samo određenoj valnoj duljini, nego se analizira cijelo područje spektra. Dobivene vrijednosti pokazuju srednje jako vezanje, a u skladu su s istraživanjima vezanja makrolida na BSA iz literature.<sup>31</sup>

Tablica 3. Univarijatna i multivarijatna analiza fluorimetrijskih podataka za titracije BSA s makrozona pomoću programa *HypSpec 2014*.

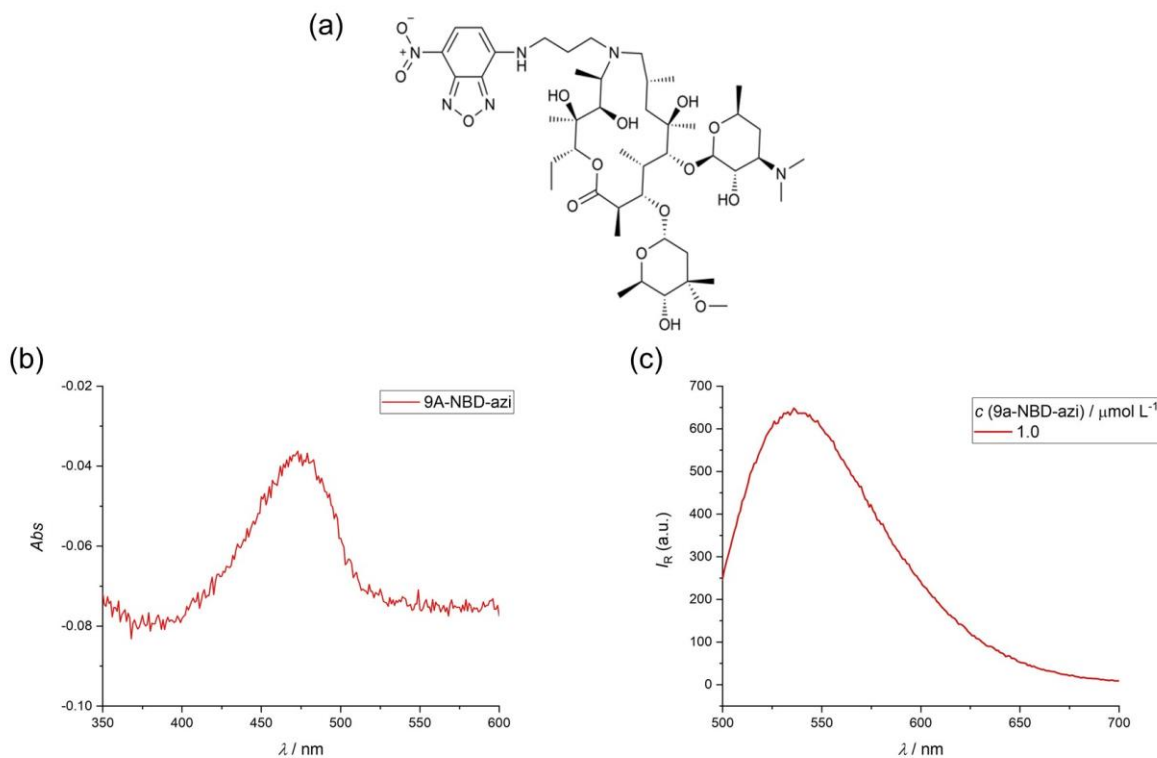
Sustav	Univarijatna analiza		Multivarijatna analiza		
	log $K_s$	$K_s / \text{L mol}^{-1}$	log $K_s$	$K_s / \text{L mol}^{-1}$	$s_d$
2 + BSA	4,75	$5,62 \cdot 10^4$	4,96	$9,19 \cdot 10^4$	0,0083
3 + BSA	5,00	$1,00 \cdot 10^5$	4,78	$6,07 \cdot 10^4$	0,0093

Pretpostavlja se da do interakcija s BSA dolazi preko desozamina na makrozonu. Uz to, do interakcija potencijalno dolazi i preko tiosemikarbazonskog bočnog lanca što povećava konstantu vezanja. Rezultati se slažu s literaturnim podacima gdje su metodom STD NMR proučavane interakcije makrolida s BSA, a opisane su i interakcije preko desozamina.<sup>31</sup> Kombinacijom spektrofluorimetrijskih metoda i spektroskopije STD NMR moguće je dakle dobiti uvid u stukturu i interakcije derivata makrolida s proteinom BSA.

#### 4.2.2. Interakcije makrozona s ribosomom

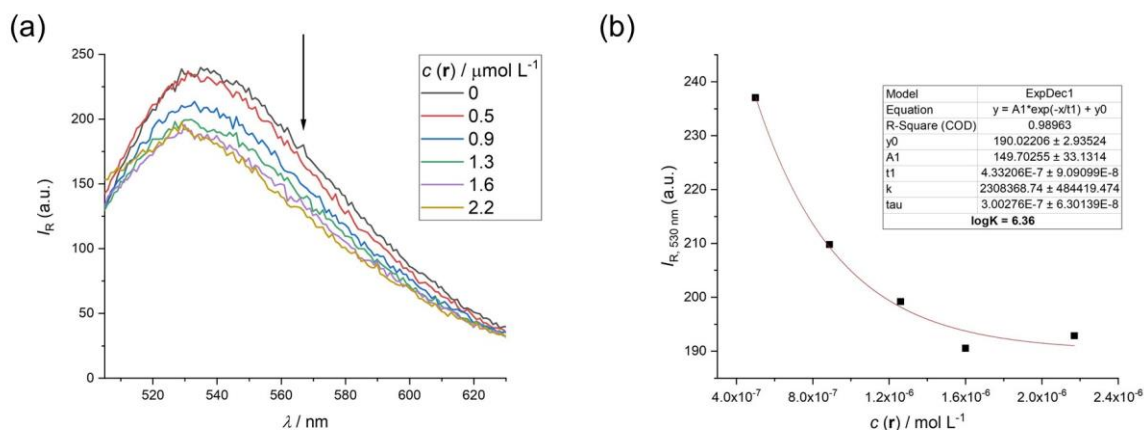
Zbog niskih relativnih intenziteta fluorescencije, emisijski spektri otopina makrozona **1–3** nisu se mogli koristiti za analizu interakcija s ribosomom. Ovaj problem bilo je moguće riješiti na dva načina: kovalentnim vezanjem fluorofora na antibiotik ili kompeticijskim eksperimentima s fluorescirajućim ligandom. Budući da se vezanjem fluorofora može utjecati na aktivnost i afinitet vezanja makrolida, kompeticijski eksperimenti pokazali su se kao bolje rješenje.<sup>24,25</sup> U ovom radu je kao kompetitor korišten fluorescentno obilježeni derivat azitromicina, 9-deokso-9a-{3-[(7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-il)amino]propil}-9a-aza-9a-homoeritromicin A (9a-NBD-azi). Navedeni spoj odabran je zbog biološke aktivnosti i farmakokinetičkih svojstava koja su najbližnja azitromicinu.<sup>41</sup> Na slici 17 prikazana je njegova struktura, apsorpcijski spektar i emisijski spektar uz valnu duljinu pobude od 475 nm ( $c_0 = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ).





Slika 17. (a) Struktura fluorescentno obilježenog derivata azitromicina, 9a-NBD-azi, (b) apsorpcijski spektar 9a-NBD-azi ( $c_0 = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , (c) emisijski spektar 9a-NBD-azi ( $c_0 = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

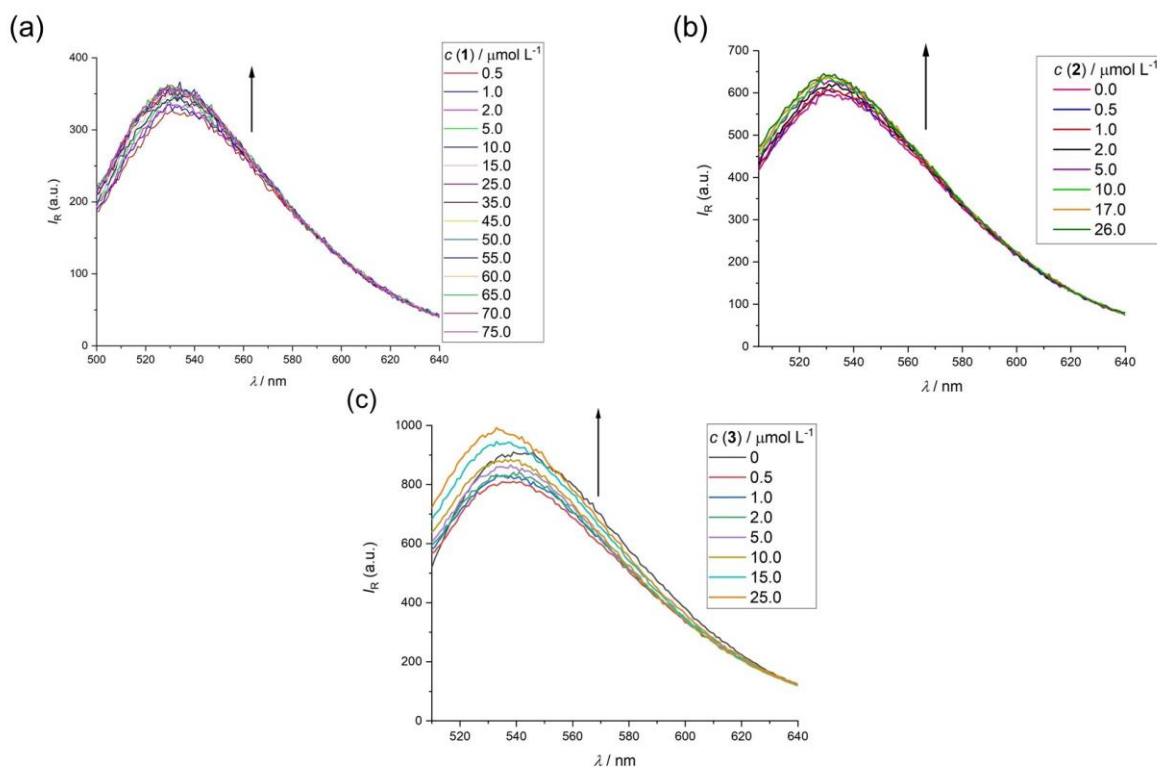
Prvi dio istraživanja interakcija makrozona **1–3** s ribosomom obuhvatio je titraciju spoja 9a-NBD-azi s ribosomom i procjenu konstante vezanja. Reakcijom spoja 9a-NBD-azi i ribosoma nastaje kompleks 9a-NBD-azi-ribosom što se manifestira gašenjem fluorescencije. Nelinearnom regresijom titracijskih podataka pri  $\lambda_{\text{maks}} = 530 \text{ nm}$  izračunata je konstanta vezanja za nastanak kompleksa 9a-NBD-azi-ribosom stehiometrije 1:1 (slika 18). Konstanta iznosi  $2,29 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ , što odgovara  $\log K = 6,36$  i upućuje na srednje jako vezanje spoja 9a-NBD-azi na ribosom.



Slika 18. (a) Fluorencijski spektar titracije spoja 9a-NBD-azi ( $c_0 = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) s ribosomom ( $c_0 = 7,88 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) pri  $\lambda_{\text{eksc}} = 475 \text{ nm}$ , (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\text{maks}} = 530 \text{ nm}$  o množinskoj koncentraciji ribosoma u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; nelinearna regresija podataka titracije za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1 prikazana je crvenom linijom.

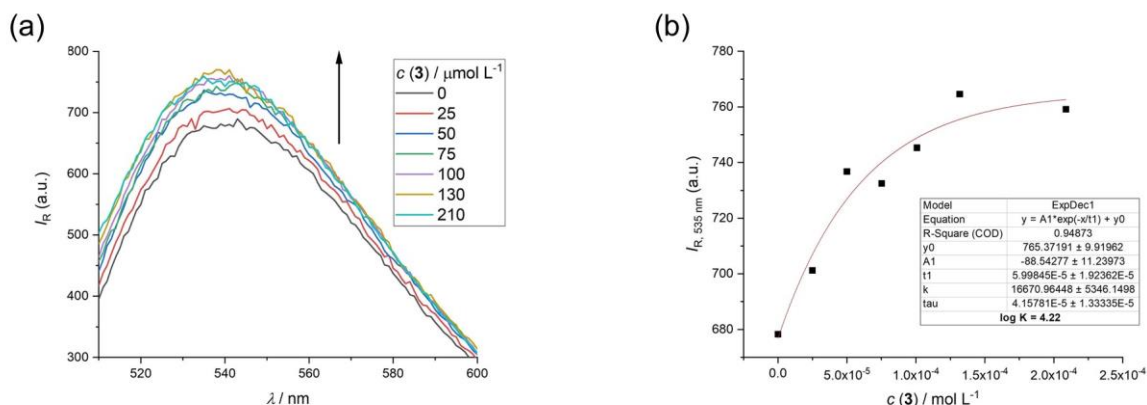
Zbog već spomenutih nedostataka kovalentnog povezivanja fluorofora, za određivanje konstante vezanja makrozona na ribosom korišteni su kompeticijski eksperimenti prema metodi IDA.<sup>27</sup>

Dodatkom ribosoma u otopinu fluoresceirajućeg derivata 9a-NBD-azi došlo je to formiranja kompleksa 9a-NBD-azi-ribosom stehiometrije 1:1, što je rezultiralo gašenjem fluorescencije. Potom je titracijom dobivenog kompleksa dodatkom makrozona 1–3 došlo do ponovnog porasta intenziteta fluorescencije što je ukazalo na nastanak kompleksa makrozona i ribosoma uz istovremeno istiskivanje kompetitora iz veznog mjesta na ribosomu.



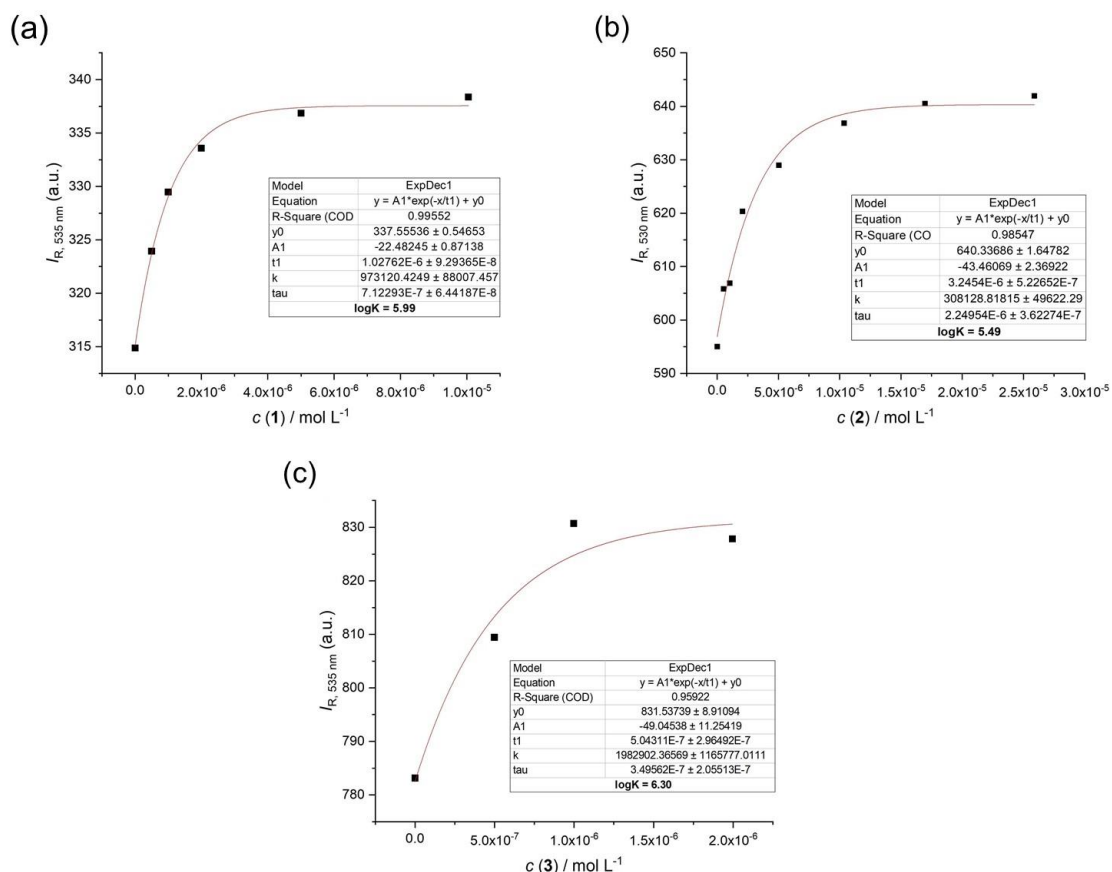
Slika 19. Fluorescencijski spektri titracije otopine 9a-NBD-azi/ribosom s makrozonima: (a) **1**,  $c_0 = 4,96 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) **2**,  $c_0 = 5,38 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; **3**,  $c_0 = 1,76 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Na slici 19 prikazani su fluorescencijski spektri titracije otopine 9a-NBD-azi/ribosom s makrozonima **1–3**. U sva tri spektra vidljiv je porast intenziteta fluorescencije dodatkom makrozona i blagi plavi pomak valne duljine maksimuma emisije. Zanimljiv podatak je porast intenziteta dodatkom spoja **3** na vrijednost (984 a.u.) veću od početne vrijednosti slobodnog kompetitora (901 a.u.). Iz tog razloga provedena je i fluorimetrijska titracija otopine 9a-NBD-azi spojem **3** bez dodatka ribosoma. Na slici 20.a moguće je vidjeti porast vrijednosti intenziteta fluorescencije dodatkom spoja **3** u otopinu 9a-NBD-azi što ukazuje na interakcije između fluoresceirajućeg derivata i ispitivanog spoja. Međutim, porast intenziteta je svakako manji nego u otopini s ribosomom.



Slika 20. (a) Fluorencijski spektri titracije otopine 9a-NBD-azi makrozonom **3** ( $c_0$  (9a-NBD-azi) =  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>,  $c_0$  (**3**) =  $1,76 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>, pH = 7) pri 25 °C, (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\max} = 535$  nm o množinskoj koncentraciji ribosoma u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,  $c_0$  (9a-NBD-azi) =  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) pri 25 °C; crvena linija predstavlja eksponencijalnu funkciju dobivenu na temelju podataka titracije za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1.

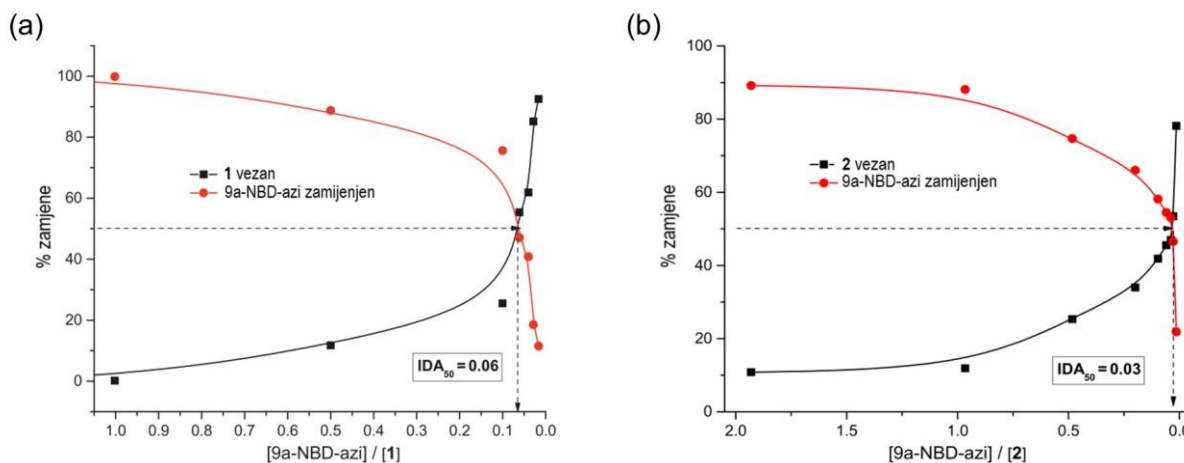
Podaci su zatim korišteni za izračun IDA<sub>50</sub> vrijednosti pomoću koje je određen afinitet vezanja. Nelinearnom regresijom (slika 18) je na temelju titracijske krivulje 9a-NBD-azi i ribosoma izračunata konstanta vezanja fluoresirajućeg derivata na ribosom. Iz krivulja titracije smjese 9a-NBD-azi i ribosoma s makrozonima **1** i **2** (slika 21) dobivene su krivulje ovisnosti postotka zamjene o omjeru množinskih koncentracija 9a-NBD-azi i makrozona (slika 22). Crvena linija prikazuje istiskivanje spoja 9a-NBD-azi, dok crna linija prikazuje istovremeno vezanje makrozona. Iz sjecišta krivulja vezanog makrozona i zamijenjenog 9a-NBD-azi izračunata je vrijednost IDA<sub>50</sub> gdje dolazi do 50%-tne izmjene kompetitora analitom.<sup>27</sup> Množenjem vrijednosti IDA<sub>50</sub> s konstantom vezanja 9a-NBD-azi i ribosoma procijenjene su konstante vezanja makrozona **1** i **2** na ribosom.



Slika 21. Ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$  o množinskoj koncentraciji makrozona: (a) **1**,  $c_0 = 4,96 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) **2**,  $c_0 = 5,38 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; **3**,  $c_0 = 1,76 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Crvena linija predstavlja eksponencijalnu funkciju dobivenu na temelju podataka titracije za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1.

Tablica 4. Dobivene konstante vezanja 9a-NBD-azi i makrozona na ribosom u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

spoj	log $K_S$	$K_S / 10^5 \text{ L mol}^{-1}$
9a-NBD-azi	6,36	22,9
<b>1</b>	5,14	1,37
<b>2</b>	4,84	0,69



Slika 22. Ovisnost postotka zamjene o omjeru množinskih koncentracija 9a-NBD-azitromicina i makrozon **1**, odnosno **2** u kompeticijskom eksperimentu. Određene vrijednosti  $IDA_{50}$  iznose 0,06 i 0,03.

Obradom dobivenih podataka izračunata je vrijednost  $IDA_{50} = 0,06$  za makrozon **1** i 0,03 za makrozon **2**. Male vrijednosti  $IDA_{50}$  pokazuju da makrozoni moraju biti prisutni u velikom suvišku kako bi došlo do potpune zamjene kompetitora iz veznog mjesta ribosoma.

Konstante vezanja fluoresceirajućeg derivata na ribosom te makrozona na ribosom izračunate su univarijatno, iz titracijskih krivulja. Izračunata konstanta vezanja 9a-NBD-azi na ribosom izračunata je za stehiometriju 1:1, a iznosi  $\log K$  (9a-NBD-azi-ribosom) = 6,36, odnosno  $K = 2,3 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ . Procjena konstante vezanja makrozona na ribosom stoga se može izračunati množeći vrijednosti  $\log K$  za kompleks 9a-NBD-azi/ribosom s vrijednošću  $IDA_{50}$  za pojedini makrozon. Tako su izračunate su konstante stabilnosti kompleksa:  $K(\mathbf{1}) = 1,37 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1}$  i  $K(\mathbf{2}) = 6,9 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ .

Osim toga, izračunata je i konstanta interakcije kompetitora 9a-NBD-azi i makrozon **3** prema modelu 1:1 koji je imao najmanje stardarno odstupanje. Procijenjena je vrijednost  $\log K = 2,95$  uz  $s_d = 0,1365$ .

Iz dobivenih rezultata vidi se da makrozon **1** pokazuje dva puta jače vezanje na ribosom od makrozona **2** što proizlazi iz činjenice da je dobivenja  $IDA_{50}$  vrijednost za makrozon **1** dva puta veća od one za makrozon **2**.

Usporedba vezanja makrozona **1** i **2** na ribosom i vezanja makrozona **2** i **3** na BSA prikazana je u tablici 4. Izračunate vrijednosti konstanti vezanja su usporedive. Makrozon **2** pokazuje jače vezanje na BSA, nego na ribosom, međutim dobivene konstante su usporedive.

Tablica 5. Usporedba dobivenih konstanti vezanja makrozona s BSA i ribosomom u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Spoj	$K / 10^5 \text{ L mol}^{-1}$	
	BSA	ribosom
<b>1</b>	-	1,37
<b>2</b>	0,92	0,69
<b>3</b>	0,61	27500
9a-NBD-azi	-	22,9

Podaci o afinitetu i stehiometriji vezanja makrozona **1–3** na biološke mete uspoređeni su s njihovom antibakterijskom aktivnošću *in vitro*. U tablici 6 navedene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za azitromicin iproučavane makrozone. Moguće je uočiti da makrozoni pokazuju dobru aktivnost na Gram-pozitivne (G+) bakterije, te nešto slabiju aktivnost na Gram-negativne (G-) bakterije. Za različite makrozone opažena je relativno slična biološka aktivnost. Makrozoni **1** i **2** pokazuju umjerenu aktivnost protiv ribosoma iz *E. coli* (MIK  $64 \mu\text{g L}^{-1}$ ) što je u skladu s dobivenim konstantama vezanja. Međutim, za makrozon **3** nije zabilježena biološka aktivnost (MIK  $>64 \mu\text{g L}^{-1}$ ). S druge strane, niklov kompleks makrozona **3** pokazao je znatno bolji inhibitorni efekt protiv ribosoma iz *E. coli* (MIK  $8 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Stoga će se daljnja istraživanja ovih spojeva usmjeriti i na njihove komplekse, kako bi se razvili spojevi još bolje biološke aktivnosti na rezistentne bakterijske sojeve.

Tablica 6. Antibakterijska aktivnost *in vitro* azitromicina (azi) i ispitivanih makrozona 1–3.

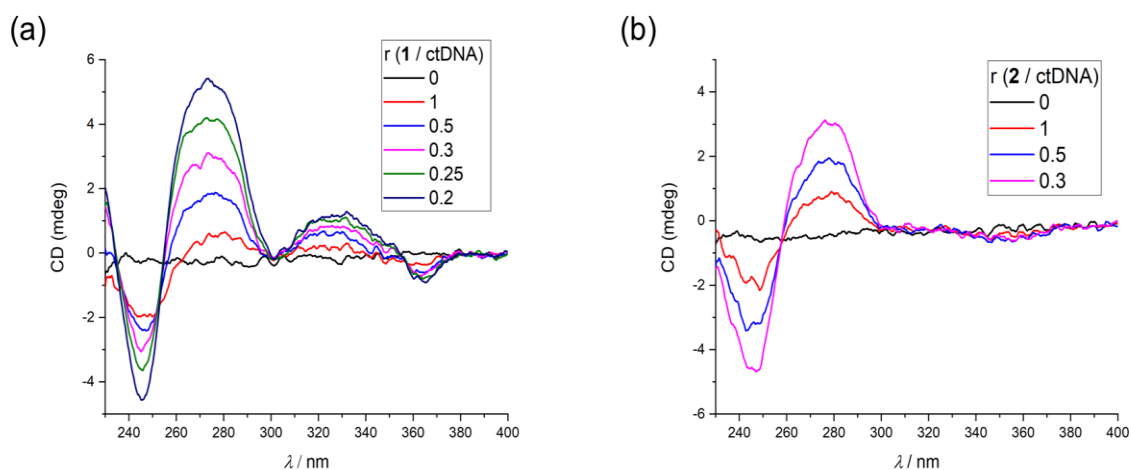
Spoj	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G-	G-	
	<i>S. pneumoniae</i> B0652	<i>S. pneumoniae</i> B0326	<i>S. pneumoniae</i> B0633	<i>S. pyogenes</i> B0542	<i>S. pyogenes</i> B0545	<i>S. pyogenes</i> B0544	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> B0331	<i>S. aureus</i> B0330	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7752
azi	≤ 0,125	16	> 64	≤ 0,125	16	> 64	1	> 64	> 64	8	≤ 0,125	> 64	> 64
<b>1</b>	≤ 0,125	1	> 64	0,5	–	–	8	16	> 64	4	–	64	> 64
<b>2</b>	1	64	> 64	4	–	–	8	16	16	4	–	64	> 64
<b>3</b>	≤ 0,125	2	32	1	–	–	4	8	> 64	2	–	> 64	> 64
<b>Ni-3</b>	≤ 0,125	16	> 64	≤ 0,125	16	> 64	2	> 64	> 64	8	≤ 0,125	8	> 64

### 4.3. Cirkularni dikroizam

Za određivanje načina vezanja korištena je i metoda cirkularnog dikroizma (CD). Analizirani makrozoni sami po sebi su akiralni zbog čega ne daju aktivan CD spektar. Međutim, zbog formiranja kompleksa sa polinukleotidima može se postići uniformna orijentacija kromofora makrozona s obzirom na kiralnu os polinukleotida. Ova pojava naziva se inducirani cirkularni dikroizam (ICD), a njegov predznak i veličina mogu dati informacije o načinu vezanja.<sup>43</sup> Signali u spektrima CD polinukleotida DNA i RNA javljaju se pri valnim duljinama koje su manje od 300 nm. U području valnih duljina iznad 300 nm analizirani spojevi absorbiraju zračenje, dok su polinukleotidi CD neaktivni. Općenito, pozitivan ICD signal s intenzitetom većim od CD signala DNA/RNA ukazuje na vezanje malog utora na DNA/RNA. Negativan ICD signal u titracijskim eksperimentima ukazuje na interkalacijsko vezanje.<sup>39,40</sup>

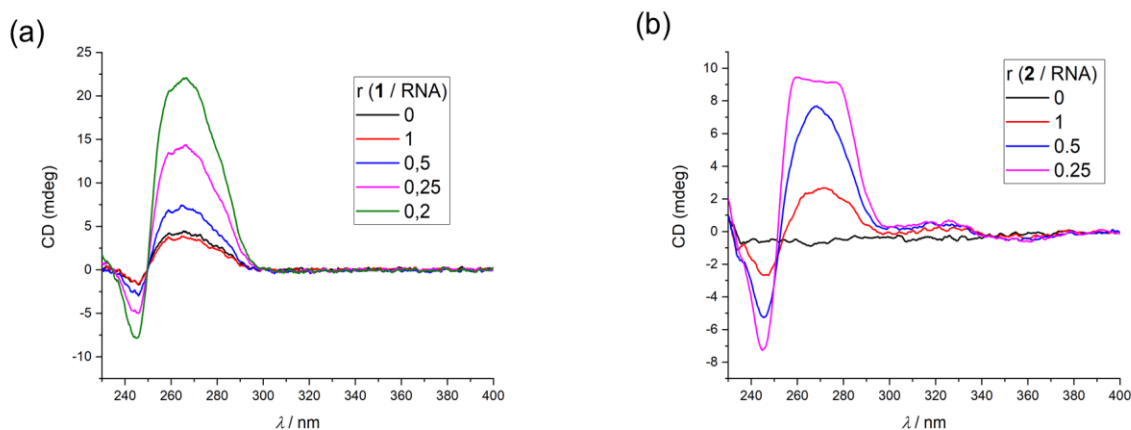
U CD spektru spoja **1** u interakciji s DNA vidljiv je izraženiji ICD signal nego za spoj **2** (slika 23). Navedena promjena može se pripisati većem utjecaju makrozona **1** na strukturu DNA, odnosno na nastanak kompleksa makrozona s DNA.





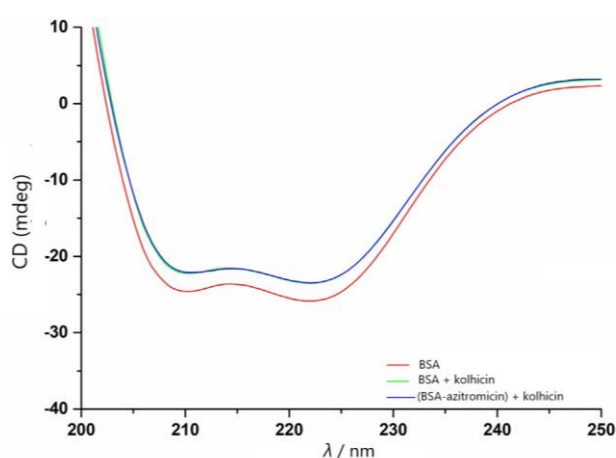
Slika 23. CD titracije makrozona: (a) **1** ( $c = 1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) i (b) **2** ( $c = 3,95 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) s DNA pri množinskim omjerima  $r$  [makrozon] / [DNA] = 0,2–1 u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Provedbom titracije makrozona **1** s RNA nije došlo do promjena u spektru CD, niti pojave novih ICD signala, dok je za makrozon **2** došlo do malih promjena (slika 24), što ukazuje na postojanje interakcija između makrozona **2** i RNA te promjene u sekundarnoj strukturi RNA.



Slika 24. CD titracije (a) makrozona **1** ( $c = 1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) i (b) makrozona **2** ( $c = 3,95 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) s RNA pri množinskim omjerima  $r$  [makrozon] / [RNA] = 0,2–1 u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Kod interakcija makrozona s BSA očekivale su se promjene u intenzitetu CD vrpce proteina (kao na slici 25 za lijek kolhicin) koje bi ukazivale na promjenu njegove sekundarne strukture pod utjecajem makrozona. Međutim, pri titracijama proučavanih spojeva s BSA nisu uočene promjene intenziteta vrpce, što može ukazivati na postojanje slabih ili ne postojanje interakcija između makrozona i BSA (slika D5). Usporedbom dobivenih rezultata s podacima za azitromicin vidljivo je da ni dodatak azitromicina, niti ispitivanih makrozona ne uzrokuje promjene u CD spektru receptora. Stoga se može zaključiti da metoda CD u ovom slučaju nije primjenjiva za istraživanja interakcija makrolida s biološkim metama.



Slika 25. CD spektar BSA bez dodatka i s dodatkom kolhicina, odnosno azitromicina.<sup>31</sup>

## § 5. ZAKLJUČAK

Interakcije nekoliko 4"-aril-makrozona s ribosomom izoliranim iz bakterije *E. coli*, proteinom BSA i nukleinskim kiselinama uspješno su okarakterizirane metodama spektrofotometrije, spektrofluorimetrije i cirkularnog dikroizma.

Problem niskog odziva riješen je korištenjem fluorescentnog derivata azitromicina, 9a-NBD-azi, koji je omogućio praćenje interakcija slabo fluoresceirajućih makrozona.

Uspješno je proučeno vezanje makrozona **2** i **3** na BSA pri čemu su konstante vezanja za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1 određene univarijatom i multivarijatom analizom. Makrozoni **2** i **3** pokazali su srednje jako vezanje na BSA.

Kombinacijom univarijatomne analize vezanja fluorescentnog kompetitora, 9a-NBD-azitromicina na ribosom i kompeticijskih eksperimenata s makrozonima **1** i **2**, uz korištenje IDA metodologije, uspješno su procijenjene konstante vezanja makrozona na ribosom. Male IDA<sub>50</sub> vrijednosti pokazale su da makrozoni moraju biti prisutni u velikom suvišku kako bi došlo do potpune zamjene kompetitora iz veznog mjesta ribosoma.

Dobiveni podaci za interakcije makrozona **1** i **2** slažu se s njihovom umjerenom biološkom aktivnosti, a može se zaključiti da na biološku aktivnost ovih spojeva, osim afiniteta vezanja, utječu i brojni drugi čimbenici, poput konformacije, veznih epitopa te mjesta vezanja i orijentacije makrozona unutar kompleksa s ribosomom.

Metodom cirkularnog dikroizma pokušao se odrediti način vezanja makrozona. Međutim, nije došlo do značajnih razlika u spektrima, stoga se može zaključiti da metoda nije primjenjiva na ispitivanom sustavu.

Na kraju, može se zaključiti da se fluorimetrijskim mjerenjima mogu uspješno okarakterizirati interakcije makrozona s ribosomom i BSA. Poznavanje interakcija makrozona, biološke aktivnosti, konformacija i orijentacija makrozona unutar kompleksa s ribosomom, veznih epitopa te drugih čimbenika i svojstava, važan je korak za otkriće i dizajn novih, učinkovitijih antibiotika.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

ABC-F	ABC-binding cassette (engl. <i>ATP-binding cassette F</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CD	cirkularni dikroizam
ctDNA	DNA iz telećeg timusa (engl. <i>calf thymus DNA</i> )
DMSO	dimetil-sulfoksid
FP	fluorescencijska polarizacija (engl. <i>fluorescent polarization</i> )
ICD	inducirani cirkularni dikroizam (engl. <i>induced circular dichroism</i> )
IDA	engl. <i>indicator displacement assay</i>
iMLS	inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogamine
M	efluks rezistencija na makrolide
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NOE	engl. <i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	engl. <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
pApU	dvolančani polinukleotid sastavljen od lanca baze A i njemu komplementarnog lanca sastavljenog od baze U
rRNA	ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )
STD	metoda prijenosa zasićenja (engl. <i>saturation transfer difference</i> )
tRNA	prijenosna ribonukleinska kiselina (engl. <i>transfer ribonucleic acid</i> )
trNOESY	prijenosni NOESY (engl. <i>transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> )
9a-NBD-azi	9-deokso-9a-{3-[(7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-il)amino]propil}-9a-aza-9a-homoeritromicin A

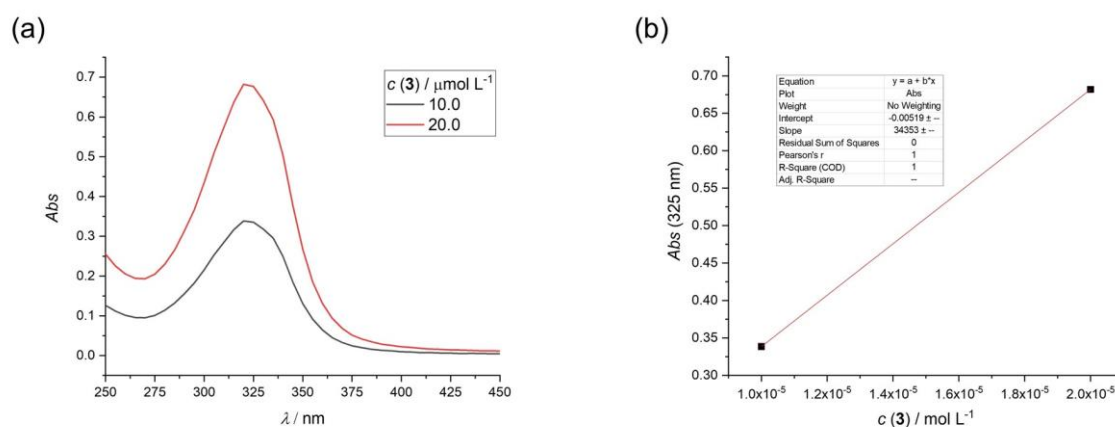
## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Zuckerman, *Infect. Dis. Clin. N. Am.***18** (2004) 621-649.
2. G. G. Zhanel, M. Dueck, D. J. Hoban, L. M. Vercaigne, J. M. Embil, A. S. Gin, J. A. Karlowsky, *Drugs***61** (2001) 443-498.
3. G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.***174** (2017) 2967-2983.
4. H.S. Oh, H.Y. Kang, *J. Org. Chem.***77** (2012) 1125-1130.
5. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Betroša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents***5** (2020) 1-5.
6. A. Liljas, *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Lund, Sweden, 2013, str. 248-253.
7. D. P. Clark, N. J. Pazdrenik, M. R. McGehee, *Molecular Biology* (Third Edition), 2019, 397-444.
8. <https://zdravlje.eu/2012/02/14/translacija-proteina/> (datum pristupa 30.01.2023.)
9. F. Traunmuller, R. Gatringer, M. A. Zeitlinger, W. Graninger, M. Muller, C. Joukhadar, *J. Chromatogr.***B822** (2005) 133-136.
10. B. Weisblum, *Drug Resist. Updat.***1** (1998) 29-41.
11. R. Leclercq, *Clin. Infect. Dis.***34**(2002) 482-92.
12. C. Fyfe, T. H. Grossman, K. Kerstein, J. Sutcliffe, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.***6**(2016) a025395.
13. W. Su, V. Kumar, Y. Ding, R. Ero, A. Serra, B. S. T. Lee, A. S. W. Wong, J. Shi, S. K. Sze, L. Yang, Y.-G. Gao, *PNAS***115**(20) (2018) 5157-5162.
14. R. Ero, V. Kumar, W. Su, Y.-G. Gao, *Protein Sci.***28** (2019) 684-693.
15. J. Parra-Ruiz, C. Vidailiac, M. J. Rybak, *Rev. Esp. Quimioter.***25**(1) (2012) 10-16.
16. G. Di Bonaventura, A. Pompilio, M. Monaco, F. P. de Araujo, L. Baldassarri, A. Pantosti, G. Gherardi, *J. Med. Microbiol.***68** (2019) 148-160.
17. I. Mikulandra, T. Jednačak, B. Bertoša, J. P. Vuković, I. Kušec, P. Novak, *Materials***14** (2021) 1-10.
18. D. Udhayakumari, S. Suganya, S. Velmathi, *J. Lumin.* **141** (2013) 48-52.

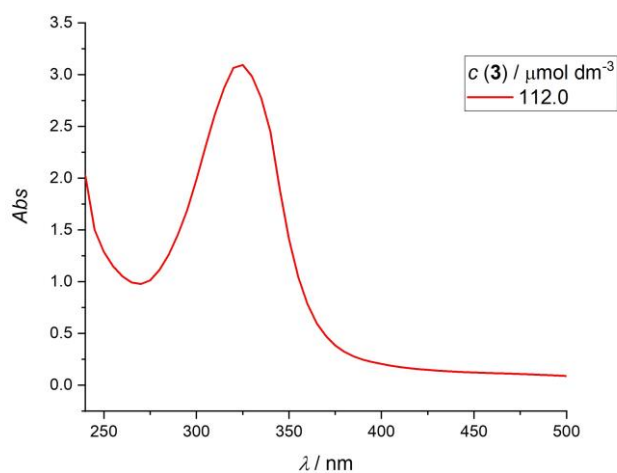
19. K. Pičuljan, *Struktura i vodikove veze derivata tiosemikarbazona u otopini*, Doktorski rad, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014., str. 5–11.
20. J. Lindon, G. Tranter, D. W. Koppenaal, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2nd edition, Jordan Hill, Oxford, 2010.
21. <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2019/december/what-is-the-difference-between-fluorescence-phosphorescence-and-luminescence?/> (datum pristupa 10.01.2023.)
22. A. Bhambhani, S. Thakkar, S. B. Joshi, C. R. Middaugh, *Therapeutic Protein Drug Products*, Woodhead publishing, 2012, 13-45.
23. D. Onidas, D. Markovitsi, S. Marguet, A. Sharonov, T. Gustavsson, *J. Phys. Chem. B***106** (2002) 11367–11374.
24. I. Mikulandra, *Priprava, karakterizacija i biološka aktivnost makrozona, novih derivata azitromicina*, Doktorski rad, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2022.
25. A. G. Tereshchenkov, A. V. Shishkina, V. V. Karpenko, V. A. Chertkow, A. L. Konevega, P. S. Kasatsky, A. A. Bogdanov, N. V. Sumbatyan, *Biochem.***81** (2016) 1163-1172.
26. J. Li, I. H. Kim, E. D. Roche, D. Beeman, A. S. Lynch, C. Z. Ding, Z. Ma, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 794-797.
27. A. C. Sedgwick, J. T. Brewster II, T. Wu, X. Feng, S. D. Bull, X. Qian, J. L. Sessler, T. D. James, E. V. Anslyn, X. Sun, *RSC Chem. Soc. Rev.***50** (2021) 9-38.
28. P. Brandt-Rauf, R. Vince, R. LeMahieu, S. Pestka, *Antimicrob. Agents Chemother.***14** (1978) 88-94.
29. M. van de Weert, L. Stella, *J. Mol. Struct.* **998** (2011) 144-150.
30. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Boston, MA, 2006, 277-230.
31. T. A. Wani, A.H. Bakheit, A. A. Al-Majed, N. Altwaijry, A. Baquaysh, A. Aljuraissy, S. Zargar, *J. Mol. Liq.* **333** (2021) 115934.
32. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.***21** (2020) 1-26.
33. P. Novak, P. Tepeš, V. Lazić, *Croat. Chem. Acta***80** (2007) 211–216.
34. P. Novak, Z. Banić Tomišić, P. Tepeš, G. Lazarevski, J. Plavec, G. Turkalj, *Org. Biomol. Chem.***3** (2005) 39-47.

35. P. Novak, I. Tatić, P. Tepeš, S. Koštrun, J. Barber, *J. Phys. Chem.***110** (2006) 580-588.
36. P. Novak, P. Tepeš, V. Lazić, *Croat. Chem. Acta.***80** (2007) 211-216.
37. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Arsić, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. Košutić-Hulita, *Bioorg. Med. Chem.***17** (2009) 5857-5867.
38. <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/circular-dichroism-spectroscopy/> (datum pristupa 15.01.2023.)
39. G. N. Kabasheva, L. S. Sandakhchiev, A. P. Sevastyanov, *FEBS Lett.***14** (1971) 161-164.
40. A. J. Adler, G. D. Fasman, M. Tal, *Biochem. Biophys. Acta.* **213** (1970) 424-436.
41. M. Matijašić, V. Munić Kos, K. Nujić, S. Čužiš, J. Padovan, G. Kragol, S. Alihodžić, B. Mildner, D. Verbanac, V. Eraković Haber, *Pharmacol. Res.***66** (2012) 332-342.
42. R. Langlois, C. R. Cantor, R. Vince, S. Pestka, *Biochem.***16**(1977) 2349-2356.
43. V. Rep, R. Štulić, S. Koštrun, B. Kuridža, I. Crnolatac, M. Radić Stojković, H. Čipčić Paljetak, M. Perić, M. Matijašić, Silvana Raić-Malić, *RSC Med. Chem.* (2022) 1-23.
44. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949-960.

## § 8. DODATAK

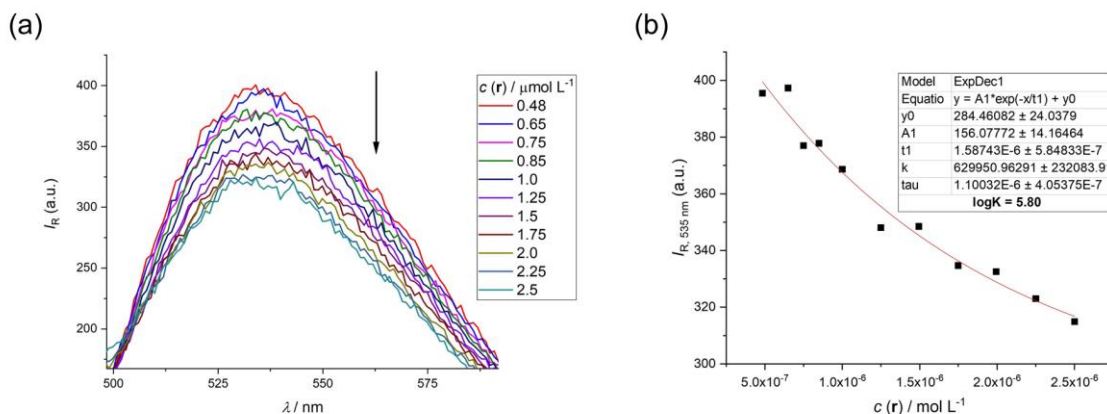


Slika D1. (a) UV-VIS spektar otopine makrozona **3** s valnom duljinom emisije  $\lambda_{\text{maks}} = 320$  nm, (b) ovisnost apsorbancije o koncentraciji makrozona u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol L $^{-1}$ , pH = 7).

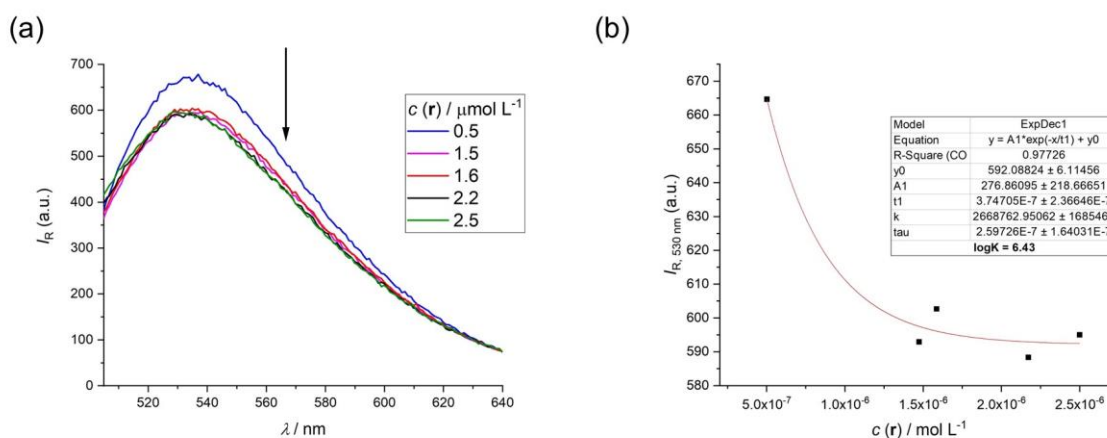


Slika D2. Spektar UV-Vis otopine kompleksa 9a-NBD-azitromicin-makrozon **3** ( $c = 1,12 \cdot 10^{-4}$  mol L $^{-1}$ ) s valnom duljinom emisije  $\lambda_{\text{maks}} = 320$  nm.

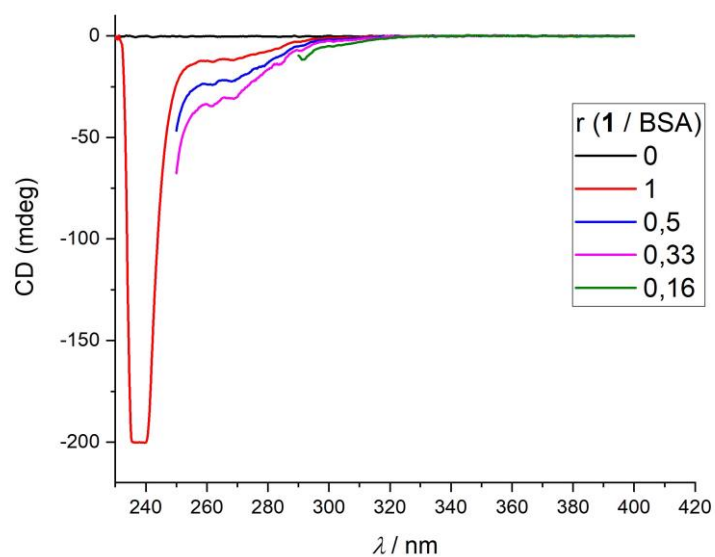




Slika D3. (a) Fluorescencijski spektri titracije otopine 9a-NBD-azi ribosomom ( $c_0$  (9a-NBD-azi) =  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ,  $c_0$  (ribosom) =  $7,88 \cdot 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol L, pH = 7) pri 25 °C, (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{max} = 535$  nm o množinskoj koncentraciji ribosoma u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol L $^{-1}$ , pH = 7,  $c_0$  (9a-NBD-azi) =  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ) pri 25 °C; crvena linija predstavlja eksponencijalnu funkciju dobivenu na temelju podataka titracije za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1.



Slika D4. (a) Fluorescencijski spektri titracije otopine 9a-NBD-azi ribosomom ( $c_0$  (9a-NBD-azi) =  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ,  $c_0$  (ribosom) =  $7,88 \cdot 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol L $^{-1}$ , pH = 7) pri 25 °C, (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{max} = 530$  nm o množinskoj koncentraciji ribosoma u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol cm $^{-3}$ , pH = 7,  $c_0$  (9a-NBD-azi) =  $1,00 \cdot 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ) pri 25 °C; crvena linija predstavlja eksponencijalnu funkciju dobivenu na temelju podataka titracije za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1.



Slika D5. CD spektar BSA bez dodatka i s dodatcima makrozona **1** u različitim omjerima  $[\text{makrozon}] / [\text{RNA}] = 0,2-1$  ukakodilatnompuferu ( $I = 0,05 \text{ molL}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Monika Kapustić

Datum rođenja: 20. travnja. 1999

Mjesto rođenja: Varaždin

### Obrazovanje

2005. –2013. Osnovna škola Ivana Kukuljevića Sakcinskog, Ivanec

2013. –2017. Srednja škola Ivanec, Ivanec

2017. –2020. Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb  
Završni rad: *Ketoprofen*

2020. – danas Diplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu, grane analitička i organska kemija

2022. Međunarodna studentska razmjena, Erasmus+ studijska razmjena,  
Sveučilište u Beču (University of Vienna), Beč

2022. –2023. Stručna praksa, Selvita d.o.o., DMPK odjel

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019 Dan i noć na PMF-u

2019. – 2021. Znanstvene čarolije

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

2022. Simpozij studenata kemičara, Zagreb, Hrvatska