

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana M. Aleksić

**DERIVATI RAMNOLIPIDA I 4-
AMINOHINOLINA KAO INHIBITORI
VIRULENCIJE KOD VRSTA *Pseudomonas
aeruginosa* I *Serratia marcescens***

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivana M. Aleksić

**DERIVATIVES OF RHAMNOLIPIDS AND
4-AMINOQUINOLINE AS *Pseudomonas
aeruginosa* AND *Serratia marcescens*
VIRULENCE INHIBITORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

MENTOR: dr **Slaviša Stanković**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet,

MENTOR: dr **Lidija Šenerović**, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo,

ČLANOVI KOMISIJE:

dr **Slaviša Stanković**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet,

dr **Lidija Šenerović**, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo,

dr **Dejan Opsenica**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i
metalurgiju,

Datum odbrane: _____

Mojim roditeljima, hvala vam na svemu!

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu. Ovom prilikom želim da se zahvalim pre svega šefu laboratorije dr Branki Vasiljević, na ukazanoj prilici da svoju karijeru započnem u njenoj Laboratoriji kao i na savetima u istraživačkom radu koji su mi bili neizmerno dragoceni.

Izuzetnu zahvalnost dugujem svojim mentorima i članovima komisije,

dr Lidiji Šenerović, mom mentoru, naučniku čiji me je uspeh motivisao. Još dok sam kao volonter, a kasnije kao master student došla u Laboratoriju, Lidija me je naučila svim tehnikama koje sam savladavala tokom godina, naučila me je da razmišljam kao istraživač i da kritički posmatram svoje rezultate. Hvala na razumevanju, savetima i znanju koje si mi pružila tokom svih ovih godina.

dr Slaviši Stanković, hvala na svom trudu i pomoći tokom izrade ove teze, a posebno hvala na svim konsultacijama, razumevanju i velikoj pomoći. Neizmerno ću vam uvek biti zahvalna na dugogodišnjoj saradnji i mentorstvu još od master studija.

i dr Dejanu Opsenici, hvala na svim korisnim savetima koje sam dobijala tokom godina zajedničke saradnje. Hvala za večiti optimizam i veru u potencijal naših jedinjenja. Hvala na razumevanju, strpljenju, uloženom trudu i brojnim diskusijama koje smo vodili.

Veliko hvala i dr Ivani Morić, na brojnim savetima kako u toku mog istraživačkog rada, tako i tokom pisanja teze. Hvala na vremenu uloženom u ispravke moje teze i hvala na svim divnim komentarima koji su doprineli kvalitetu moje teze.

Posebnu zahvalnost dugujem mojim divnim kolegama iz Laboratorije 05. Hvala kolegama Mariji i Dušanu na podršci, prijateljstvu, velikoj pomoći u eksperimentalnom radu kao i na vremenu provedenom u diskutovanju svih važnih rezultata. Hvala Sanji i Lidiji na podršci, razumevanju i na uvek prijatnoj radnoj atmosferi. Hvala svim kolegama, Jasmini, Sandri, Tanji, Mini, Nadi, Jeci i Saši.

Hvala i mojoj kumi Ivani, mom najboljem prijatelju još od detinjstva, na svakom trenutku provedenom zajedno, od školske klupe pa do dan danas. Hvala mojoj Adi, koja je postavila visoko lestvicu uspeha koju sam morala da ispratim, hvala Gogi na strpljenju, pomoći i želji za novim saznanjima i naravno hvala svim mojim dragim prijateljima na podršci.

Derivati ramnolipida i 4-aminohinolina kao inhibitori virulencije kod vrsta

Pseudomonas aeruginosa i *Serratia marcescens*

SAŽETAK

Rezistencija bakterija na antibiotike je rastući problem globalnih razmera tako da su pronalaženje i uvođenje novih terapijskih opcija u borbu protiv bakterijskih infekcija postali prioriteta i fundamentalnih i primenjenih istraživanja.

U potrazi za jedinjenjima prirodnog porekla sa anti-virulentnom aktivnošću izdvojen je nepatogeni soj iz rizosfere biljke dobračice (*Glechoma hederacea*), *Lysinibacillus* sp. BV152.1, čiji su metaboliti inhibirali formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1. Hemijske analize su pokazale da aktivnu komponentu etil acetatnog ekstrakta čini smeša ramnolipida. Uporednom analizom anti-biofilm aktivnosti utvrđeno je da su di-ramnolipidi soja *Lysinibacillus* sp. BV152.1 bolji inhibitori procesa formiranja biofilma (adhezije i sazrevanja) kod *P. aeruginosa* PAO1 od komercijalno dostupnih ramnolipida, poreklom iz *P. aeruginosa*. Amidnom derivatizacijom di-ramnolipida poboljšana je njihova anti-biofilm aktivnost, gde je najaktivniji derivat di-ramnolipida iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 imao morfolinsku grupu i inhibirao je formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 za 80% u koncentraciji od 100 µg/ml, a isti derivat u koncentraciji od 50 µg/ml inhibirao je formiranje biofilma *S. marcescens* za 88%.

Hinolini, jedinjenja sa širokim spektrom bioloških aktivnosti, a takođe i autoinduceri PQS signalnog puta međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa* predstavljaju dobru osnovu za razvoj anti-virulentnih jedinjenja. Derivati aminohinolina sintetisani u ovoj studiji nisu pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost prema Gram negativnim patogenima. Najveću inhibitornu aktivnost na formiranje biofilma kod *P. aeruginosa* i *S. marcescens* imala su jedinjenja koja su sadržala atom hlora ili CF₃ grupu na poziciji C(7) i alifatični lanac sa 12 C atoma na poziciji C(4) (jedinjenja **5** i **10**), sa BFIC50 koncentracijama od 69 µM odnosno 63 µM. Ova jedinjenja su prvi derivati hinolina za koje je utvrđena sposobnost da inhibiraju biofilmove *S. marcescens*. Detaljnom analizom odnosa strukture i aktivnosti jedinjenja **5** i **10** je pokazano da dužina alifatičnog lanca i lipofilnost jedinjenja imaju najveći uticaj na formiranje biofilma kod *S. marcescens*. Jedinjenje **10** je izdvojeno kao najpotentniji inhibitor proizvodnje piocijanina kod *P. aeruginosa* hinolinske prirode opisan do sada.

Dalja derivatizacija je išla u pravcu modifikacije jedinjenja AQ8 (N-oktanamino-4-aminohinolin) benzil grupama radi identifikovanja strukturnih zahteva za poboljšanje njegove anti-virulentne aktivnosti. Jedinjenje sa benzofuranom (jedinjenje **34**) se izdvojilo kao najpotentniji inhibitor formiranja biofilмова *P. aeruginosa* PAO1 i PQS signalnog puta. Prediktivni model ukazuje da se jedinjenje **34** vezuje za PqsR receptor za isto mesto kao i prirodni autoinduceri. Dodatne interakcije sa aminokiselinskim ostacima receptora preko amino alkil bočnog lanca i N-benzil supstituenta omogućavaju inhibiciju PqsR receptora jakim i stabilnim vezama. Ovi rezultati su ukazali da su amino alkil bočni lanci 4-aminohinolina pogodno mesto za njihovu dalju modifikaciju u pravcu dobijanja potentnijih inhibitora PQS sistema međubakterijske komunikacije.

Ključne reči: *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Lysinibacillus* sp., anti-virulentna aktivnost, ramnolipidi, hinolini, PQS, PqsR.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

UDK broj: 577.19: [579.61:616-092](043.3)

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is a growing problem on a global scale, so finding and introducing new therapeutic options to combat bacterial infections has become a priority in both fundamental and applied research.

In a search for structurally new compounds with anti-virulent activity, novel non-pathogenic strain was isolated from the rhizosphere of a *Glechoma hederacea* plant, named BV152.1, whose metabolites inhibited the formation of *P. aeruginosa* PAO1 biofilms. Chemical analyzes have shown that the active compound of ethyl acetate extract is a mixture of rhamnolipids. Comparative analysis of their anti-biofilm activity revealed that the di-rhamnolipids from the strain *Lysinibacillus* sp. BV152.1 are better inhibitors of *P. aeruginosa* PAO1 biofilm adhesion and maturation, than commercially available rhamnolipids, originated from *P. aeruginosa*. The amide derivatization of di-rhamnolipids enhanced the anti-biofilm activity of these compounds, where the most active di-rhamnolipid derivative from *Lysinibacillus* sp. BV152.1 had a morpholine group and inhibited the formation of *P. aeruginosa* PAO1 biofilms by 80% at a concentration at 100 µg/ml. The same derivative at 50 µg/ml inhibited formation of *S. marcescens* biofilm by 88%.

Quinolines, compounds with a wide range of biological activities, and autoinducers of the quorum sensing PQS signaling pathway of *P. aeruginosa* represent a good basis for the development of compounds with anti-virulent activity. The aminoquinoline derivatives synthesized in this study did not show significant antibacterial activity against Gram-negative pathogens, making them suitable chemical structures for the development of anti-virulent agents. The highest inhibitory activity of *P. aeruginosa* and *S. marcescens* biofilm formation showed compounds containing a chlorine atom (compound **5**) or CF₃ group (compound **10**) at position C(7) and an aliphatic chain of 12 C atoms at position C(4) with BFIC₅₀ concentrations of 69 µM and 63 µM, respectively. These compounds are the first quinoline derivatives identified to have the ability to inhibit *S. marcescens* biofilms formation. Detailed analysis of the structure and activity relationships of compounds **5** and **10** showed that the aliphatic chain length and lipophilicity of the compounds had the greatest influence on inhibition of biofilm formation in *S. marcescens*.

Compound **10** was the most potent inhibitor of *P. aeruginosa* pyocyanin production of a quinoline nature described so far ($IC_{50} = 2.5 \mu M$).

Further derivatization of long-chained aminoquinolines went towards structural modification of the compound AQ8 (N-octanamino-4-aminoquinoline) with benzyl groups, with the aim to identify structural parameters required for improving its anti-virulent activity. The benzofuran-substituted compound (compound **34**) appeared as the most potent inhibitor of *P. aeruginosa* PAO1 biofilm formation and PQS signaling pathway. According to the model predicting the binding orientation of compound **34** for PqsR receptor, its quinoline ring binds to the same site as native autoinducers. Amino alkyl side chain and N-benzyl substituent of **34** form additional strong and stable bonds with amino acid residues of the receptor causing inhibition of PqsR receptor. These results suggested that the side chains are preferred target for further modification for obtaining more potent inhibitors of the PQS signaling pathway. The results of this study indicate that long-chained 4-aminoquinolines are promising chemical structures for the further development of potent inhibitors of PQS signaling pathway.

Key words: *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Lysinibacillus* sp., anti-virulent activity, rhamnolipids, quinolines, PQS, PqsR.

Scientific field: Biology

Specific subfield: Microbiology

UDC number: 577.19: [579.61:616-092](043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opšte karakteristike vrsta <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i <i>Serratia marcescens</i>	1
1.2. Proces uspostavljanja infekcija bakterijama <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. marcescens</i>	3
1.2.1. Patogeneza infekcija izazvanih vrstom <i>P. aeruginosa</i>	3
1.2.2. Patogeneza infekcija izazvanih vrstom <i>S. marcescens</i>	4
1.3. Faktori virulencije vrsta <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. marcescens</i>	4
1.3.1. Međubakterijska komunikacija	5
1.3.1.1. Međubakterijska komunikacija kod vrste <i>P. aeruginosa</i>	6
1.3.1.2. Međubakterijska komunikacija kod vrste <i>S. marcescens</i>	9
1.3.2. Pokretljivost vrsta <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. marcescens</i>	10
1.3.3. Lipopolisaharid kod vrsta <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. marcescens</i>	12
1.3.4. Najvažniji pigmenti vrsta <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. marcescens</i>	13
1.3.5. Ekstracelularni faktori virulencije <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. marcescens</i>	15
1.3.5.1. Ekstracelularni faktori kod <i>P. aeruginosa</i>	15
1.3.5.2. Ekstracelularni faktori kod <i>S. marcescens</i>	18
1.3.6. Biofilm	19
1.3.6.1. Proces formiranja biofilmova	20
1.3.6.2. Karakteristike biofilmova kod <i>P. aeruginosa</i>	21
1.3.6.3. Karakteristike biofilmova kod <i>S. marcescens</i>	23
1.4. Lečenje bakterijskih infekcija – problem rezistencije na antibiotike.....	24
1.4.1 Alternativne strategije u lečenju infekcija izazvanih vrstama <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. marcescens</i>	27
1.4.2. Jedinjenja prirodnog porekla sa anti-virulentnim aktivnostima.....	29
1.4.3. Hemijski sintetisana jedinjenja sa anti-virulentnom aktivnošću	30
1.4.3.1. Analizi homoserin laktona	31
1.4.3.2. Hinolini i njihovi derivati	32
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	35
3. MATERIJAL I METODE	37
3.1. Bakterijski sojevi i njihova kultivacija	37
3.1.1. Mikrobiološke podloge	37
3.1.2. Izolacija bakterija iz rizosfere biljaka	38
3.1.3. Dugoročno čuvanje bakterijskih sojeva	39

3.1.4. Kultivacija bakterija	39
3.2. Ekstrahovanje sekundarnih metabolita bakterija i njihova hemijska karakterizacija	40
3.2.1. Pripremanje ukupnih ekstrakata iz bakterijske kulture	40
3.2.2. Razdvajanje bakterijskih ekstrakata na frakcije i strukturna karakterizacija aktivnog jedinjenja	40
3.2.2.1. Tankoslojna hromatografija (TLC)	40
3.2.2.2. Prečišćavanje na koloni	41
3.2.2.3. Tečna hromatografija i masena spektrometrija	41
3.2.2.4. Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) i masena spektroskopija.....	42
3.3. Sinteza i derivatizacija jedinjenja	42
3.3.1. Derivatizacija jedinjenja di-ramnolipida	42
3.3.2. Sinteza aminohinolina i njihova derivatizacija	43
3.4. Testiranje anti-virulentnih aktivnosti prečišćenih sekundarnih metabolita i hemijski sintetisanih jedinjenja i njihovih derivata	43
3.4.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)	43
3.4.2. Uticaj jedinjenja na formiranje biofilmova kod <i>P. aeruginosa</i> PAO1 i <i>S. marcescens</i>	44
3.4.2.1. Uticaj jedinjenja na formiranje biofilmova kod <i>P. aeruginosa</i> PAO1 i <i>S. marcescens</i> nakon faze adhezije	45
3.4.2.2. Ispitivanje anti-adhezivnog potencijala jedinjenja	45
3.4.2.3. Ispitivanje uticaja jedinjenja na fluorescenciju GFP	46
3.4.2.4. Uticaj jedinjenja na disperziju već formiranog biofilma	46
3.4.3. Ispitivanje uticaja jedinjenja na različite vrste pokretljivost <i>P. aeruginosa</i> PAO1	47
3.4.3.1. Uticaj jedinjenja na plivanje <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	47
3.4.3.2. Uticaj jedinjenja na rojenje <i>P. aeruginosa</i> PAO1	47
3.4.3.3. Uticaj jedinjenja na grčenje <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	47
3.4.4. Ispitivanje uticaja jedinjenja na međubakterijsku komunikaciju sojeva <i>C. violaceum</i> CV026 i <i>S. marcescens</i> u testu sa diskovima.....	48
3.4.5. Uticaj jedinjenja na produkciju piocijanina kod <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	48
3.4.6. Uticaj jedinjenja na produkciju elastaze.....	49
3.5. Vizualizacija biofilmova mikroskopijom	49
3.5.1. Fluorescentna mikroskopija	50
3.5.2. Elektronska mikroskopija.....	51

3.6. Ispitivanje uticaja jedinjenja na signalne puteve međubakterijske komunikacije	52
3.6.1. Kvantifikacija produkovanih autoinducera signalnih puteva.....	52
3.6.2. Kompetitivna inhibicija receptora međubakterijske komunikacije.....	53
3.7. Određivanje toksičnosti jedinjenja.....	54
3.7.1. Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja na ćelijama MRC5 ćelijske linije	54
3.7.2. Ispitivanje toksičnosti jedinjenja na model sistemu <i>Caenorhabditis elegans</i>	55
3.7.3. Ispitivanje toksičnosti jedinjenja na model sistemu embriona zebriće <i>Danio rerio</i>	56
3.8. Molekularno-biološke metode	58
3.8.1. Izolacija ukupne DNK.....	58
3.8.2. Umnožavanje gena za 16S rRNK.....	58
3.8.3. Agarozna gel elektroforeza	59
3.8.4. Sekvenciranje gena 16S rRNK.....	59
3.8.5. Analiza uticaja derivata 4-aminohinolina na ekspresiju gena uključenih u međubakterijsku komunikaciju	60
3.8.5.1. Izolacija ukupne RNK	60
3.8.5.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) na osnovu izolovane RNK	60
3.8.5.3. Umnožavanje cDNK Real Time PCR metodom	61
3.9. Statistička analiza rezultata.....	63
4. REZULTATI	64
4.1. Identifikacija jedinjenja prirodnog porekla sa sposobnošću inhibicije formiranja biofilmova kod patogenih bakterija	64
4.1.2. Anti-biofilm aktivnost ramnolipida i derivata di-ramnolipida.....	69
4.1.3. Uticaj di-ramnolipida na kretanje rojenjem <i>P. aeruginosa</i> PAO1	79
4.1.4. Ispitivanje citotoksičnosti testiranih ramnolipida	79
4.2. Hemijski sintetisana jedinjenja sa inhibitornim dejstvom na virulentne karakteristike patogenih bakterija	80
4.2.1. Sinteza različitih derivata 4-aminohinolina.....	80
4.2.2. Testiranje antibakterijske aktivnosti derivata 4-aminohinolina prema izabranim bakterijskim sojevima	82
4.2.3. Uticaj derivata 4-aminohinolina na produkciju bakterijskih pigmenata prodigiozina i violaceina	83
4.2.4. Inhibicija formiranja biofilmova derivatima 4-aminohinolina.....	84
4.2.5. Uticaj derivata 4-aminohinolina na produkciju piocijanina.....	88

4.2.6. Uticaj derivata 4-aminohinolina na proizvodnju autoinducera signalnih puteva međubakterijske komunikacije vrste <i>P. aeruginosa</i>	88
4.2.7. Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti, modelovanje inhibicije formiranja biofilma kod <i>S. marcescens</i>	89
4.3. Optimizacija strukture 4-amino-7-hlor-hinolina dugog lanca u cilju povećanja anti-virulentnog efekta, <i>N'</i> -supstituisanih derivati 4-amino-7-hlor-hinolina.....	91
4.3.1. Ispitivanje anti-virulentnog potencijala <i>N'</i> -supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na <i>P. aeruginosa</i> PAO1	92
4.3.1.1. Uticaj <i>N'</i> -supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na signalne puteve međubakterijske komunikacije vrste <i>P. aeruginosa</i> u eseju kompeticije za receptor	96
4.3.1.2. Uticaj <i>N'</i> -supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na produkciju autoinducera signalnih puteva međubakterijske komunikacije vrste <i>P. aeruginosa</i> ..	97
4.3.1.3. Uticaj <i>N'</i> -supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor hinolina na ekspresiju gena uključenih u međubakterijsku komunikaciju	98
4.3.2. Predviđanje orijentacije vezivanja jedinjenja 4 (AQ8) i 34 za PqsR receptor	99
4.3.3. Ispitivanje anti-virulentnog potencijala <i>N'</i> -supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na <i>S. marcescens</i> ATCC 27117	100
4.3.4. Ispitivanje citotoksičnosti <i>N'</i> -supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor hinolina na MRC5 ćelijskoj liniji	1022
4.3.5. Ispitivanje citotoksičnosti <i>N'</i> -supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na <i>in vivo</i> modelu <i>C. elegans</i>	102
4.3.6. Ispitivanje toksičnosti derivata <i>N'</i> -supstituisanih 4-amino-7-hlor-hinolina <i>in vivo</i> na modelu zebrice (<i>Danio rerio</i>)	103
5. DISKUSIJA	106
5.1. Anti-virulentni agensi prirodnog porekla.....	107
5.2. Hemijski sintetisana jedinjenja kao anti-virulentni agensi	111
6. ZAKLJUČCI	118
7. LITERATURA	122

SPISAK SKRAĆENICA

AMB	L-2-amino-4-metoksi- <i>trans</i> -3-butenoična kiselina
AHL	Acil-homoserin lakton
AQ8	4-amino hinolin sa C8 alifatičnim nizom
BFIC ₅₀	koncentracija testiranog jedinjenja pri kojoj je infibirano 50% formiranja biofilmova
BDIC ₅₀	koncentracija testiranog jedinjenja pri kojoj se formirani biofilm rasturi 50%
CFU	<i>eng.</i> Colony forming unit
C4-HSL	N-(butiril)-homoserin lakton
DKP	Diketopiperazin
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DMAP	Dimetilaminopiridin
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sulfoksid
di-Rha-Bn	Benzenom supstituisan di-ramnolipid
di-Rha-Pip	Piperidinom supstituisan di-ramnolipid
di-Rha-Mor	Morfolinom supstituisan di-ramnolipid
di-Rha-TBDMS	Međuproizvod derivatizacije, odnosno trimetil sililacije
eDNK	Ekstracelularni molekuli DNK
ExoA	Egzotoksin A
F3	Aktivna frakcija ekstrakta <i>Lysinibacillus</i> sp. BV152.1
HAA	3-(3-hidroksialkanoiloksi) alkanoična kiselina
HHL	N-heksanoil-L-homoserin lakton
HHQ	2-heptil-4-hidroksihinolin
HLB	Hidrofilno-lipofilna ravnoteža
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi
HSL	Homoserin lakton
LC-MS	Tečna hromatografija-masena spektroskopija
logP	Particioni koeficijent
MAP	2-metil-3-amilpirol
MBC	4-metoksi-2,2 bipirol-5-karboksialdehid
Mbp	Milion baznih parova
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MTT	(3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid)
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
NMR	Nuklearna magnetna rezonanca
OD	<i>eng.</i> Optical density
PQS	2-heptil-3-hidroksi-4-hinolin
pKa	Konstanta disocijacije kiselina
QS	Međubakterijska komunikacija, <i>eng.</i> Quorum sensing
ROS	Reaktivna kiseonična jedinjenja
RNK	Ribonukleinska kiselina
R90	Smeša ramnolipida poreklom od <i>P. aeruginosa</i> sp.
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
SAM	S-adenosil metionin
TLR5	<i>eng.</i> Toll like receptor
TLC	Tankoslojna tečna hromatografija

TBDMS
3-oxo-C12-HSL
Čpf

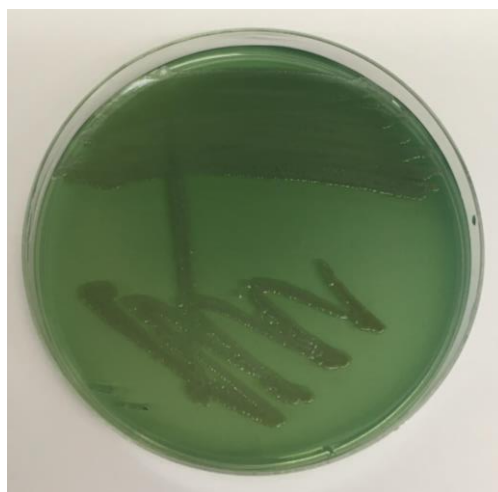
Tert-butidimetilsilil
N-(3-oksododekanoil)-homoserin laktona
Časova posle fertilizacije

1. UVOD

1.1. Opšte karakteristike vrsta *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens*

Pseudomonas aeruginosa je oportunistička patogena bakterija od velikog medicinskog značaja koja, na osnovu izveštaja Svetske zdravstvene organizacije (SZO), spada u grupu bakterija za koje je potrebno što pre naći adekvatnu terapiju (World Health Organisation, 2017). Ova bakterijska vrsta uzročnik je infekcija kod ljudi i životinja, i to najčešće kod imunokompromitovanih pacijenata čije je lečenje znatno otežano zbog sve učestalije pojave rezistencije na jedan ili veći broj antibiotika. Ovaj soj se adaptira na različite sredinske uslove i uspešno kolonizuje tkiva obolelih osoba. Spada u Gram-negativne, pokretne, katalaza-pozitivne, aerobne, odnosno fakultativno anaerobne bakterije štapićastog oblika. U prirodi je ova vrsta široko rasprostranjena i obično nastanjuje zemljište, vodu ili biljke, a ima sposobnost degradacije toksičnih hemikalija kao što su hidrokarbonati i aromatična jedinjenja (Palleroni, 2005). Optimalna temperatura za rast ove bakterije je 37 °C, ali ono što je izdvaja od drugih vrsta roda *Pseudomonas* je to što može da preživi temperaturu od 42 °C (Palleroni, 2015). Kolonije *P. aeruginosa* imaju specifičnu tamnozelenu boju (Slika 1) koja je posledica sinteze pigmenta piocijanina, odnosno pioverdina (Westman *et al.*, 2010).

Genom ove vrste spada među veće bakterijske genome sa više od 6 Mbp (million baznih parova) (Valot *et al.*, 2015), kao i veliki broj konzerviranih gena u genomu.



Slika 1. Izgled kolonija soja *P. aeruginosa* PA14 na Petrijevoj šolji

P. aeruginosa pripada rodu *Pseudomonas* (grčki „pseudo” – lažni, „monas” – jedinica), porodici Pseudomonadaceae i klasi Gamaproteobakterija (Tabela 1). Rod *Pseudomonas* je prvi put opisao botaničar Valter Migel 1894. godine, a već je u Bergeovoj Knjizi o sistematici u bakteriologiji objavljenoj 1923. godine rod *Pseudomonas* je opisan na osnovu fenotipskih karakteristika (Bergey, 1923.) Ovaj rod je prolazio kroz različite izmene u pogledu broja vrsta decenijama unazad, 2005. godine opisane su 53 vrste ovog roda (Palleroni, 2005), a samo par godina kasnije taj broj je izmenjen na 128 (Euzéby, 2008).

Serratia marcescens zajedno sa još 14 vrsta pripada rodu *Serratia* (Mahlen, 2011) iz reda Enterobacteriales (Tabela 1). To je Gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterijska vrsta sa flagelama koje joj omogućavaju kretanje. Pojedine vrste roda *Serratia* sintetišu pigment prodigiozin, koji kolonijama daje karakterističnu crvenu boju (Slika 2), a produkcija ovog pigmenta zavisi od temperature gajenja i starosti kolonija.



Slika 2. Izgled kolonija soja *S. marcescens* ATCC 27117 na Petrijevoj šolji

Opisi ove bakterijske vrste se mogu naći u Pitagorinim spisama koje datiraju iz šestog veka pre nove ere, u kojima se nalaze zapisi o crvenim tragovima na hrani koji podsećaju na krv. Na početku 19. veka postoji više od 100 dokumentovanih i opisanih pojava „krvi na hrani” za koje nije postojalo naučno objašnjenje. Farmaceut Bartolemeo Bizo 1817. godine daje prvo racionalno objašnjenje za ovaj fenomen, tvrdeći da je uzrok nastanka crvenih tragova na hrani živi organizam, najverovatnije neka vrsta gljivice (Merlino, 1924).

On je i imenovao ovaj organizam kao *Serratia marcescens*, u čast italijanskog fizičara Serafina Seratija (*ital.* Serafino Serrati), dok *marcescens* ima latinsko značenje „do propadanja”, jer je uočio da crvena boja posle izvesnog vremena nestaje. Tokom vremena ime ove vrste se menjalo te je *S. marcescens* preimenovana 1848. godine u *Monas prodigiosus*, potom nešto kasnije u *Bacterium prodigiosus* (Yu, 1979), da bi kasnije konačno prvobitni naziv ove vrste, *S. marcescens*, bio usvojen kao zvaničan.

Od pojave prvih literaturnih podataka o ovoj vrsti pa sve do 1913. godine vladalo je mišljenje da ovaj mikroorganizam nije patogen, kada Vudvord i Klark prvi opisuju kliničku sliku bronhitisa sa crvenim sputumom. Danas je ovaj soj prepoznat kao oportunistički patogen koji izaziva infekcije kod ljudi, životinja i biljaka, i koji je rezistentan na većinu antibiotika koji se koriste u terapiji.

Tabela 1. Sistematika vrsta *P. aeruginosa* i *S. marcescens*

Carstvo	Bakteria	
Razdeo	Proteobacteria	
Klasa	Gammaproteobacteria	
Red	Pseudomonadales	Enterobacteriales
Familija	Pseudomonadaceae	Enterobacteriaceae
Rod	<i>Pseudomonas</i>	<i>Serratia</i>
Vrsta	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>

1.2. Proces uspostavljanja infekcija bakterijama *P. aeruginosa* i *S. marcescens*

1.2.1. Patogeneza infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa*

P. aeruginosa izaziva infekcije kod ljudi, životinja, biljaka i gljiva. Infekcije ovim sojem se najčešće razvijaju kod imunokompromitovanih pacijenata obolelih od cistične fibroze, raka ili side (Lister *et al.*, 2009). Kao oportunistički patogen *P. aeruginosa* je široko rasprostranjen u bolnicama gde je i česta pojava unakrsnih kontaminacija. Poznato je da ova bakterija izaziva upalu pluća, infekcije urinarnog trakta, hiruških rana, rana dijabetičara, infekcije kože nakon ozbiljnijih opekotina, kao i infekciju očnog sočiva, a u retkim slučajevima dolazi i do sepse (Driscoll *et al.*, 2007).

Patogeneza *P. aeruginosa* odvija se u tri faze. Prva faza predstavlja *kolonizaciju domaćina*, odnosno vezivanje za tkivo kože. Da bi bakterije mogle da izvrše inicijalnu adheziju, prva linija imunološke odbrane domaćina mora biti oslabljena.

Posredstvom flagele i pila ćelije uspevaju da se vežu za tkivo domaćina, a ovom procesu takođe pomažu i sekretovani lipopolisaharidi. U sledećoj fazi, *fazi proliferacije* bakterijskih ćelija i povećanja populacije, važnu ulogu ima međubakterijska komunikacija. Kada bakterijska populacija dostigne kritičnu veličinu, kao rezultat, otpočinje sinteza brojnih faktora virulencije kao što su egzotoksin A, elastaze, proteaze, ramnolipidi i egzoenzimi sekretovani sekrecionim sistemom tipa 3 (Westman *et al.*, 2010). Treća faza odnosi se na *širenje infekcije* na druga tkiva, što u krajnjem slučaju dovodi do sistemske infekcije domaćina.

1.2.2. Patogeneza infekcija izazvanih vrstom *S. marcescens*

Vrsta *S. marcescens*, roda *Serratia*, je najčešći patogen ljudi (Mahlen, 2011). Ovaj bolnički patogen izaziva infekcije urinarnog trakta (Maki *et al.*, 1973), infekcije krvotoka i endokarditis (Korner *et al.*, 1994), meningitis (Mahlen, 2011), infekcije pluća (Gonzalez-Juarbe *et al.*, 2015) i infekcije povezane sa urinarnim kateterima (Bukhari *et al.*, 2014; Larson *et al.*, 2005).

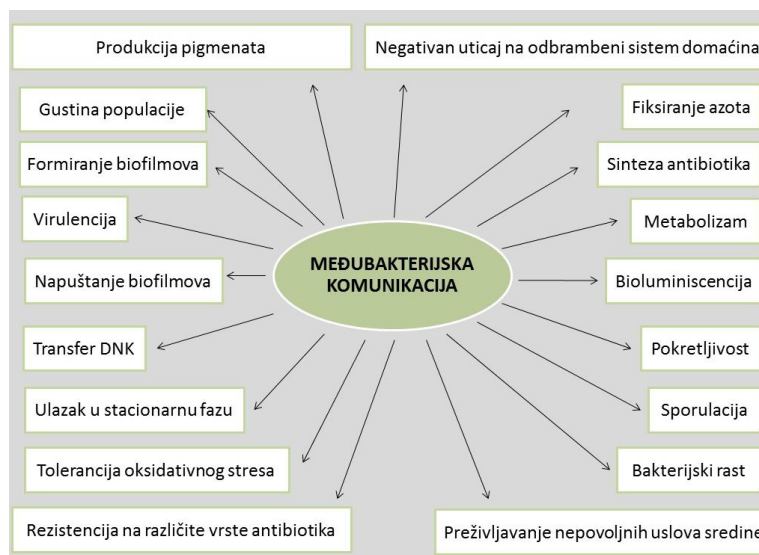
Patogeneza infekcija izazvanih *S. marcescens* ostvaruje se pomoću brojnih faktora virulencije kao što su hemolizini, proteaze, lipopolisaharidi, fimbrije i siderofore. Osim toga, ova vrsta sekretuje hitinaze, proteaze, nukleaze i lipaze (Hines *et al.*, 1988) kao i surfaktante koji omogućavaju kolonizaciju različitih površina. Pili, proteinske strukture na spoljašnjoj membrani, učestvuju u adheziji ćelija za veštačku površinu ili epitelne ćelije domaćina, kao i različiti adhezini koje ova vrsta sintetiše. Površina ćelija *S. marcescens* je hidrofobna (Mudd i Mudd, 1924) što joj omogućava kolonizaciju vodenih i uljanih površina kao i medicinskih katetera i drugih plastičnih površina (Ashkenazi *et al.*, 1986).

1.3. Faktori virulencije vrsta *P. aeruginosa* i *S. marcescens*

Sinteza virulentnih faktora bakterija je u najvećoj meri regulisana procesom međubakterijske komunikacije. Zavisi od tipa infekcije, tj. da li je u pitanju akutna infekcija, koju karakteriše planktonski načina života ili hronična infekcija, kada ćelije prelaze u stadijum biofilma. U skladu sa genotipom ćelija i mutacijama nastalih u zavisnosti od sredine u kojoj se ćelije razvijaju, sintetišu se raznovrsni virulentni faktori.

1.3.1. Međubakterijska komunikacija

Međubakterijska komunikacija (*eng.* Quorum sensing, QS) je proces produkcije i detekcije ekstracelularnih signalnih molekula, kao i odgovor na njihovo prisustvo u zavisnosti od gustine populacije. Bakterije sintetišu male molekule nazvane „autoinduceri”, koji pri visokoj gustini bakterijske populacije aktiviraju ekspresiju brojnih gena čiji su proizvodi uključeni u sintezu različitih faktora virulencije (Slika 3) (Bhardwaj *et al.*, 2013). Ovaj fenomen prvi put je opisan kod bakterijskih vrsta *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi* (Nealson i Hastings, 1979), kada je uočeno da se luminiscencija pojavljuje samo pri velikoj gustini populacije, te da je ta fenotipska karakteristika posledica međubakterijske komunikacije. Različite bakterijske vrste mogu da komuniciraju, kao i pojedinačne bakterijske ćelije unutar jedne vrste.



Slika 3. Šematski prikaz virulentnih faktora koji su pod kontrolom međubakterijske komunikacije. (Preuzeto i modifikovano iz publikacije Bhardwaj *et al.*, 2013).

Procesi međubakterijske komunikacije Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija razlikuju se po prirodi autoinducera. Generalno, međubakterijska komunikacija kod Gram-negativnih bakterija posredovana je autoinducerima koji su acil-homoserin laktoni, alkil-hinolini, α -hidroksi ketoni, tiazoli i drugi difuzibilni signalni faktori (jedinjenja nalik masnim kiselinama). Ovi molekuli bivaju sintetisani u biohemijskim procesima od masnih kiselina i S-adenosilmetionina (SAM), i slobodno difunduju kroz ćelijsku membranu. Kod Gram-pozitivnih bakterija autoinduceri su po hemijskoj prirodi oligopeptidi.

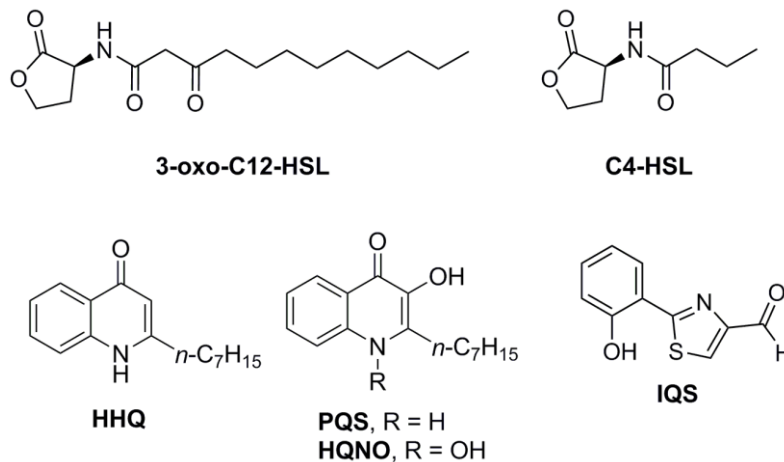
Kada je koncentracija autoinducera visoka, oni se vezuju za dvokomponentnu histidin kinazu koja se nalazi na membrani. Vezivanje aktivira kinaznu aktivnost, što rezultuje autofosforilacijom regulatora odgovora. Fosforilisan regulator potom pokreće transkripciju gena koji se nalaze pod njegovom kontrolom (Rutherford i Bassler, 2012).

Sintaza (protein I) katalizuje sintezu autoinducera homoserin laktona, dok je protein R receptor odnosno, transkripcioni aktivator. Kompleks proteina R i njemu odgovarajućeg autoinducera vezuje se za promotorski region DNK molekula i pokreće ekspresiju odgovarajućeg gena. Gen *i* je takođe meta ovog kompleksa tako da je na ovaj način pozitivnom spregom regulisana i sinteza proteina I (Papenfort i Bassler, 2016). Prvi otkriveni sistem međubakterijske komunikacije je LuxI/LuxR, kod *V. fischeri*. Svi kasnije otkriveni sistemi i regulatornih proteina nalik su prvom opisanom LuxI/LuxR, pa se često navode i kao homolozi LuxI i LuxR proteina.

1.3.1.1. Međubakterijska komunikacija kod vrste *P. aeruginosa*

Međubakterijska komunikacija kod vrste *P. aeruginosa* predstavlja centralni sistem regulacije ekspresije gena koji kodiraju sintezu virulentnih faktora. Kod *P. aeruginosa* postoje četiri sistema međubakterijske komunikacije – LasI/LasR, RhII/RhIR, PQS i IQS, koji su hijerarhijski organizovani. Homolozi LuxI/LuxR regulatornih proteina kod *P. aeruginosa* su LasI/LasR (Passador *et al.*, 1993) i RhII/RhIR (Brint i Ohman, 1995). LasI i RhII su sintaze autoinducera koje katalizuju sintezu homoserin laktona (HSL), i to N-(3-oksododekanoil)-homoserin laktona (3-oxo-C12-HSL) (Pearson *et al.*, 1994), odnosno N-(butiril)-homoserin laktona (C4-HSL) (Pearson *et al.*, 1995) (Slika 4).

Vrsta *P. aeruginosa* sintetiše još jednu familiju malih difuznih signalnih molekula – diketopiperazine (DKP) koji sintetisani u visokoj koncentraciji mogu da aktiviraju acil-homoserin laktonske (AHL) signalne puteve (Holden *et al.*, 1999).



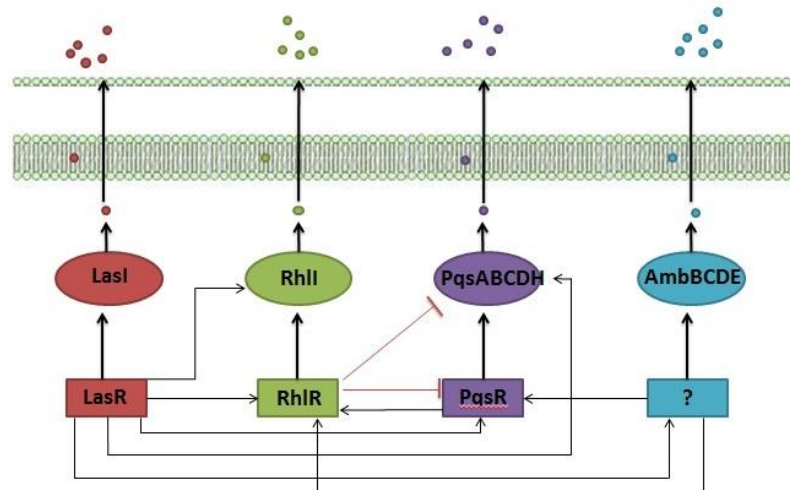
Slika 4. Autoinduceri međubakterijske komunikacije kod vrste *P. aeruginosa*

1. Las sistem. Las sistem međubakterijske komunikacije otkriven je početkom dvadesetog veka, proučavanjem fenomena sinteze elastaza/proteaza, koje kodiraju *lasA* i *lasB* geni, pa je prema njima i imenovan (Rumbaugh *et al.*, 2000). Ovaj sistem čini transkripcioni aktivator LasR, sintaza LasI i negativni transkripcioni regulator protein RsaL. LasR u kompleksu sa autoinducerom indukuje transkripciju gena *lasI* (kodira sintezu sintaze LasI) i *rsaL* (kodira sintezu RsaL regulatornog proteina), dok je sintaza LasI odgovorna za sintezu 3-oxo-C12-HSL autoinducera. Kada bakterijska populacija dostigne eksponencijalnu fazu rasta, za LasR receptor se veže autoinducer 3-oxo-C12-HSL, a zatim se kompleks autoinducer-receptor vezuje za promotore gena koji kodiraju brojne faktore virulencije, čiju ekspresiju kontroliše ovaj sistem međubakterijske komunikacije. LasR-3-oxo-C12-HSL kompleks pokreće ekspresiju gena koji su esencijalni tokom uspostavljanja infekcije, kao što su *lasB* koji kodira sintezu elastaza, *lasA* proteinaza, *toxA* egzotoksin A i *aprA* koji kodira alkalnu fosfatazu (Davies *et al.*, 1998; de Kievit i Iglewski, 2000; Jones *et al.*, 1993; Passador *et al.*, 1993). Kompleks LasR-3-oxo-C12-HSL takođe aktivira ekspresiju *lasI* gena, čime se ostvaruje autoregulacija pozitivnom povratnom spregom (Seed *et al.*, 1995). Gen *rsaL* kodira sintezu RsaL proteina, a negativno reguliše ekspresiju *lasI* i *rsaL* gena što omogućava uspostavljanje homeostaze laktona (Rampioni *et al.*, 2007).

2. Rhl sistem. RhlR receptor vezan za C4-HSL autoinducer takođe aktivira ekspresiju gena koji kodiraju sintezu faktora virulencije, ramnolipida, piocijanina, cijanovodonika, elastaza, proteaza i lektina (Lazazzera i Grossman, 1998).

Kompleks RhlR-C4-HSL pokreće ekspresiju dva gena koja su pod kontrolom *las* sistema i to *lasB* i *aprA*.

Pored njih ovaj kompleks aktivira i gene kao što su *rpoS* koji kodira sigma faktor σ^s u stacionarnoj fazi rasta bakterija, *rhlAB* koji kodiraju ramnosiltransferazu i uključeni su u sintezu ramnolipida, geni uključeni u sintezu piocijanina, *lecA* koji kodira lektin kao i *rhlI* gen, čime se uspostavlja autoregulacija pozitivnom povratnom spregom (Brint i Ohman, 1995; Latifi *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 1997; Whiteley *et al.*, 1999). Dakle, LasR-3-oxo-C12-HSL kompleks indukuje ekspresiju *rhlI* gena čime pokreće Rhl sistem međubakterijske komunikacije (Slika 5).



Slika 5. Hijerarhijska mreža međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa*, na šemi je prikazana sinteza autoinducera i međusoban odnos signalnih puteva. Strelicama je prikazan međusoban uticaj različitih signalnih puteva, svaki signalni put je različitom bojom označen, kao i odgovarajući autoinduceri.

3. PQS sistem. Treći sistem međubakterijske komunikacije je PQS sistem (*eng. Pseudomonas quinolone signal*) koji za autoinducere ima preko 50 različitih alkil-hinolina (Deziel *et al.*, 2004), među kojima se najčešće sintetišu 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolin (PQS) i njegov prekursor 2-heptil-4-hidroksihinolin (HHQ). Oba autoinducera prepoznaju regulator PqsR koji je receptor tipa LysR, a često se označava i kao MvfR (Gallagher *et al.*, 2002). PQS sistem učestvuje u regulaciji formiranja biofilmova, sintezi piocijanina, elastaza, lektina i ramnolipida (J. Lee i Zhang, 2015; Rumbaugh *et al.*, 2000). Ovaj sistem samo delimično utiče na ekspresiju *lasB* gena, zajedno sa Las i Rhl sistemima. PQS sistem pozitivno utiče na ekspresiju *rhlI* gena, dok kompleks RhlR-C4-HSL negativno utiče na PQS (Pesci *et al.*, 1999) (Slika 5).

4. IQS sistem. Četvrti, najmanje istražen, sistem međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* je IQS sistem (eng. Integrated Quorum Sensing System), i njegova je uloga u integrisanju sredinskih signala sa mrežom međubakterijske komunikacije (J. Lee *et al.*, 2013). Autoinducer ovog sistema je 2-(2-hidroksifenil)-tiazol-4-karbaldehid, dok je receptor još uvek nepoznat (J. Lee *et al.*, 2013). Ovaj sistem međubakterijske komunikacije otkriven je prilikom izučavanja mutanata *ambBCDE* gena za koje se prvobitno smatralo da su uključeni u sintezu L-2-amino-4-metoksi-*trans*-3-butenoične kiseline (AMB), ali se pokazalo da je ovaj gen odgovoran i za sintezu autoinducera IQS sistema (X. Lee *et al.*, 2010). Dosadašnja istraživanja su pokazala da ovaj sistem utiče na PQS sistem i da funkcioniše kada u spoljašnjoj sredini postoji nedostatak fosfata (Slika 5).

Ovi sistemi međubakterijske komunikacije kod vrste *P. aeruginosa* su hijerarhijski organizovani i međusobno zavisni procesi. Uslovno rečeno glavni regulator je Las sistem, koji koordiniše Rhl, PQS i IQS sisteme međubakterijske komunikacije, dok PQS sistem pozitivno reguliše Rhl sistem. S druge strane, PQS sistem je negativno regulisan od strane Rhl sistema, pa sam odnos koncentracija njihovih autoinducera igra ključnu ulogu u regulaciji ove kompleksne mreže signala (J. Lee i Zhang, 2015). Uopšteno gledano Las i IQS sistemi aktiviraju PQS sistem, on aktivira Rhl, dok IQS aktivira Las i PQS (K. Lee i Yoon, 2017) (Slika 5).

1.3.1.2. Međubakterijska komunikacija kod vrste *S. marcescens*

Međubakterijska komunikacija kod roda *Serratia* zasniva se na LuxI tipu komunikacije sa acil-homoserin laktonima (AHL) kao autoinducerima. Proteini I (homolozi LuxI sistema) učestvuju u sintezi autoinducera sa acilnim lanacima dužine od četiri do 18 ugljenikovih atoma, kao i sa supstitucijom na C3 poziciji (Kuo *et al.*, 1994). Kod različitih vrsta roda *Serratia* postoji veliki diverzitet homoserin laktone koji imaju funkciju autoinducera međubakterijske komunikacije (Wei i Lai, 2006).

Kod tri različita soja vrste *S. marcescens* ustanovljeno je da postoji pet različitih autoinducera HSL i to C4-HSL, C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL i 3-oxo-C6-HSL (Coulthurst *et al.*, 2006; Eberl *et al.*, 1996; Horng *et al.*, 2002), pri čemu je najčešći C6-HSL.

Supstratna specifičnost I proteina i dostupnost celularnog acil-ACP (acil-nosača proteina) određuje koji molekul autoinducera će biti sintetisan (More *et al.*, 1996; Parsek *et al.*, 1999). Kod različitih vrsta roda *Serratia* postoje različiti tipovi LuxIR sistema. Tako SwrIR sistem postoji kod vrste *S. liquefaciens* MG1 (Eberl *et al.*, 1996), SmaIR kod vrste *Serratia* sp. ATCC 39006 (Thomson *et al.*, 2000), SprIR kod vrste *S. proteamaculans* (A. B. Christensen *et al.*, 2003), a SpnIR kod vrste *S. marcescens* SS-1 (Horng *et al.*, 2002). Diverzitet sistema međubakterijske komunikacije kod vrste *S. marcescens* je veliki, pa je kod različitih sojeva ove vrste ustanovljeno postojanje svih pomenutih LuxIR sistema (Iguchi *et al.*, 2014). SpnIR sistem međubakterijske komunikacije reguliše kretanje nezavisno od flagele kao i sintezu biosurfaktanata, prodigiozina i nukleaza (Horng *et al.*, 2002). Tako SpnI protein učestvuje u sintezi bar četiri *N*-acil-homoserin laktona – 3-oxo-C6-HSL, C6-HSL, C7-HSL i C8-HSL, dok SpnR funkcioniše kao negativni regulator kada je vezan sa 3-oxo-C6-HSL. Glavni regulatorni geni SpnIR sistema kod *S. marcescens* smešteni su na mobilnom transpozonu (Wei *et al.*, 2006). Produkcija lipaze LipA, metaloproteaze PrtA i površinskog proteina SlaA kodirane su genima iz operona *lipBCD*. Kod *S. marcescens* ekspresiju gena *lipB* reguliše SwrI/SwrR sistem zajedno sa autoinducerom C4-HSL (Riedel *et al.*, 2001). Pored ovih egzoenzima i produkcija pigmenta prodigiozina regulisana je međubakterijskom komunikacijom.

1.3.2. Pokretljivost vrsta *P. aeruginosa* i *S. marcescens*

Tipovi kretanja *P. aeruginosa*. Flagele i pili su strukture neophodne za kretanje planktonskih ćelija. *P. aeruginosa* ima jednu flagelu na polu ćelije i više pila. Prilikom uspostavljanja infekcije bakterijska ćelija se vezuje za GM1 glikolipid epitelijalnih ćelija domaćina, a pokreće i inflamatorni odgovor slanjem signala preko TLR5 receptora (*eng.* Toll like receptor 5) do receptora Ipaf (Miao *et al.*, 2007).

Flagele se sastoje iz niza jedinica proteina flagelina, čija je sinteza kodirana genom *fliC*, i kapa proteina, koji je kodiran *fliD* genom. Flagelini se mogu podeliti na osnovu molekulske težine na tip A i tip B. U flageli kod *P. aeruginosa* soja PAO1 nalazi se flagelin tipa B, koji je glikozilovan (Verma *et al.*, 2006). Flagele omogućavaju bakterijskim ćelijama kretanje plivanjem, što se ostavlja rotacijama flagela.

Ova ćelijska struktura doprinosi virulenciji bakterija, što je pokazano na sojevima koji nemaju flagele, kod kojih je smanjena virulencija kao i mogućnost širenja infekcije (Feldman *et al.*, 1998).

Pili tipa IV su važne ćelijske strukture koje učestvuju u patogenezi *P. aeruginosa*. Pili se sastoje iz monomernih jedinica proteina pilina za čiju sintezu je odgovoran gen *pilA*. Na C terminalnom kraju svakog monomera pilina nalazi se receptor-vezujuće mesto, ali je ono funkcionalno samo kod monomerne jedinice na samom vrhu pila. Funkcionalno receptor-vezujuće mesto prepoznaje disaharide koji se nalaze na površini epitelnih ćelija. To su obično glikosfingolipidi asijalo-GM1 i asijalo-GM2 (Saiman i Prince, 1993). Mutirani sojevi bez pila imaju smanjene virulentne karakteristike, a ove strukture su i ciljevi imunološkom sistemu i antimikrobnim terapeutcima (Kipnis *et al.*, 2006).

Istovremenim pokretanjem flagele i pila ostvaruje se kretanje koje se naziva rojenje (*eng.* swarming), a koje omogućava kretanje bakterija po čvrstoj i vlažnoj površini (Kohler *et al.*, 2000; Yeung *et al.*, 2009). Ovaj tip kretanja je regulisan autoinducerima međubakterijske komunikacije, a važnu ulogu imaju i ramnolipidi (Kearns, 2010). Kretanje bakterijskih ćelija rojenjem je značajano u svim fazama formiranja biofilma (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Pored rojenja i plivanja, kretanje pokretima grčenja takođe predstavlja važan faktor virulencije (*eng.* twitching), kao specijalan tip kretanja po vlažnim i polučvrstim površinama. Ovaj tip kretanja ostvaruje se kontrakcijama pila i regulisan je ekspresijom gena *pilT* i *pilU* (Zolfaghar *et al.*, 2003). Adhezija bakterija i inicijalna faza formiranja biofilmova nije striktno uslovljena grčenjem (O'Toole i Kolter, 1998).

Tipovi kretanja *S. marcescens*. Ćelije *S. marcescens* se mogu kretati plivanjem ili rojenjem u zavisnosti od konzistencije spoljašnje sredine u kojoj rastu. Ukoliko ove bakterije žive u tečnoj sredini tada se kreću pokretima plivanja uz pomoć flagela.

U polučvrstim sredinama izgled ćelija se značajno menja, postaju izdužene, na njima se nalazi od 10 do 100 flagela na lateralnoj strani ćelija (Alberti i Harshey, 1990) i bakterije se kreću pokretima rojenja. Integracija sredinskih, međućelijskih i interćelijskih signala, kao i dostupnost nutrijenata i gustina populacije značajni su faktori koji doprinose ovim fenotipskim promenama (Alberti i Harshey, 1990). Operon *flhDC* i HSL autoinduceri glavni su genetski regulatori flagelarnog kretanja (Givskov *et al.*, 1998).

Rojenje kod soja *S. marcescens* MG1 regulisano je SwrI/SwrR sistemom koji je indukovano autoinducerima C4-HSL i C6-HSL (Eberl *et al.*, 1996). Važan faktor koji doprinosi rojenju je sinteza cikličnog lipodepsipentapeptida sa 3-hidroksi-C10 masnom kiselinom (W2) koji služi da smanji površinsku tenziju prilikom kretanja (Matsuyama *et al.*, 1992). Kod SwrI mutanata produkcija W2 molekula je zaustavljena, a može se povratiti egzogenim dodavanjem C4-HSL autoinducera.

Drugi tip kretanja, u kojem ne učestvuje flagela, je takozvano „klizanje” (A. Martinez *et al.*, 1999). Delecija *spnI* gena koji kodira sintezu dva glavna autoinducera 3-oxo-C6-HSL i C6-HSL, kao i dva sporedna autoinducera C7-HSL i C8-HSL, dovodi do redukcije ovog tipa kretanja zajedno sa gubitkom sposobnosti produkcije biosurfaktanata (Horng *et al.*, 2002). Povratak ove funkcije uspostavlja se dodavanjem autoinducera, ali i dodatkom 3-oxo-C8-HSL autoinducera, kojeg ovaj soj ne proizvodi, što ukazuje na to da *S. marcescens* detektuje i autoinducere drugih vrsta mikroorganizama/bakterija (Van Houdt *et al.*, 2007).

1.3.3. Lipopolisaharid kod vrsta *P. aeruginosa* i *S. marcescens*

Lipopolisaharidi su kompleksni glikolipidi koji se nalaze na spoljašnjoj membrani i štite bakteriju od imunološkog odgovora domaćina, kao i od delovanja antibiotika (King *et al.*, 2009). Lipopolisaharidi *P. aeruginosa* se sastoje iz tri domena: membranskog lipida koji se naziva lipid A, polisaharidnog jezgra i O-antigena. Lipid A je netipični glikolipid koji se nalazi na membrani i prolazi kroz nju jednim delom. Sastavljen je iz fosforilisanog diglukozamina koji je supstituisan različitim masnim kiselinama (Gellatly i Hancock, 2013). Posедуje funkcionalna vezujuća mesta za makrofage i CD14 receptore na ćelijama domaćina, što dalje aktivira TLR4 i NFκB signalne puteve i pokreće sintezu proinflamatornih citokina i hemokina, inflamaciju i na kraju endotoksični šok (Akira *et al.*, 2006; Teghanemt *et al.*, 2005). Ukoliko bakterijska ćelija ne preživi imunološki odgovor domaćina, lipid A se oslobađa i slobodno putuje krvotokom. Pokazano je da modifikacija lipida A može dovesti do osetljivosti bakterije na polimiksine, a može i izmeniti inflamatorni proces (King *et al.*, 2009).

Divlji sojevi *P. aeruginosa* mogu imati specifičnu strukturu lipopolisaharida, kada je na polisaharidno jezgro, sastavljeno iz 9-10 razgranatih oligosaharida, zakačen lipid A a on supstituisan O-polisaharidima.

Postoje dva strukturno različita tipa O-polisaharida: A antigen, sastavljen iz jedne vrste šećera i B antigen, sastavljen iz nizova nekoliko vrsta šećera (King *et al.*, 2009). Izolati *P. aeruginosa* iz hroničnih infekcija imaju samo A antigen koji vremenom postaje dominantan, što može biti posledica selektivnog pritiska (King *et al.*, 2009).

1.3.4. Najvažniji pigmenti vrsta *P. aeruginosa* i *S. marcescens*

Piocijanin. *P. aeruginosa* sintetizuje nekoliko različitih pigmenta fenazina, ali oko 95% svih izolata *P. aeruginosa* prvenstveno sintetizuje piocijanin (5-metil-1(5H)-fenazinon) (Mavrodi *et al.*, 2001). Piocijanin je mali molekul, rastvorljiv u vodi, plavozelene boje, sa redoks potencijalom (Lau *et al.*, 2004).

Tokom infekcije, ovaj pigment ispoljava brojne efekte na ćelijama sisara kao što su inhibicija ćelijske respiracije, cilijarne funkcije i epidermalnog ćelijskog rasta (Wilson *et al.*, 1988), remeti homeostazu kalcijuma (Denning *et al.*, 1998), inaktivira katalaze (O'Malley *et al.*, 2003) i indukuje apoptozu neutrofila (Usher *et al.*, 2002). Biosinteza piocijanina je proces regulisan međubakterijskom komunikacijom, koji otpočinje sintezom AHL autoinducera tokom faze eksponencijalnog rasta kulture, nakon čega se sintetišu autoinduceri PQS signalnog puta u kasnoj eksponencijalnoj fazi. PQS direktno kontroliše ekspresiju *phzA-G* operona što rezultira produkcijom fenazin-1-karboksilne kiseline. Ona se u ranoj stacionarnoj fazi prevodi u više produkata od kojih je piocijanin dominantan, a sam proces je regulisan *phzM* genom (Mavrodi *et al.*, 2001). Kao mali rastvorljiv molekul, piocijanin lako difunduje kroz ćelijsku membranu domaćina (Schwarzer *et al.*, 2008). Piocijanin prima elektrone od NADH pa ih donira molekulsom kiseoniku što dovodi do formiranja reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (ROS) kao što je vodonik peroksid (H_2O_2) (O'Malley *et al.*, 2004).

P. aeruginosa je važan uzročnik respiratornih infekcija kod pacijenata sa cističnom fibrozom. Cistična fibroza je oboljenje nastalo mutacijom *cftr* gena koji kodira sintezu transmembranskog proteina koji omogućava transport hloridnih jona (Lau *et al.*, 2004). Mutacije u *cftr* genu vode smanjenju broja CFTR proteina na apikalnoj membrani epitelijalnih ćelija pluća, što dovodi do smanjene sekrecije hloridnih jona, povišene koncentracije natrijuma i povećane apsorpcije vode. Smanjen protok vode dovodi do akumuliranja mukusa u disajnim putevima što čini pogodnu sredinu za razvoj mikroorganizama. Oboleli od cistične fibroze, uz hroničnu infekciju bakterijom *P. aeruginosa*, imaju oštećena tkiva, smanjenu funkciju pluća i poteškoće pri disanju.

Kod obolelih od cistične fibroze piocijanin indukuje formiranje ROS unutar ćelija, a ekstracelularno redukuje glutation do glutation disulfida ili oksidovanog glutationa (O'Malley *et al.*, 2004).

Dugo se smatralo da piocijanin nema značajnu ulogu u procesu formiranja biofilмова, (Price-Whelan *et al.*, 2006), međutim, pokazano je da se piocijanin vezuje za eDNK (ekstracelularni molekuli DNK) što pospešuje međućelijske interakcije i štiti eDNK od degradacije (Chiang *et al.*, 2013).

Prodigiozin. Produkcija pigmenta kod vrsta roda *Serratia* izuzetno varira, i zavisi od vrste, uslova sredine, a najviše od temperature. Prodigiozin (2-metil-3-pentil-6-metoksiprodiginin) je strukturno kompleksno jedinjenje, gde su dva pirolna prstena direktno međusobno vezana, dok treći pirolni prsten formira pirildipirilmelan (pyrroldipyrrolymethene) (Gerber, 1975). Monopirolni i dipirolni prekursori se sintetišu odvojeno, da bi kasnije formirali molekul prodigiozina u biosintetskoj reakciji. Konkretno, 2-metil-3-amilpirol (MAP) i 4-metoksi-2,2'-bipirol-5-karboksialdehid (MBC) sintetišu se od acetata, serina, alanina, metionina i prolina, koji se u daljoj biosintetskoj reakciji kondenzuju i formiraju prodigiozin (Morrison, 1966; Williamson *et al.*, 2005). Produkcija prodigiozina je kodirana genima *pig* klastera koji se sastoji iz 15 gena (*pigA-O*), koji diriguju sintezu prekursora i regulišu čitav biosintetski proces. Ovaj pigment mogu sintetisati samo tri vrste i to *S. marcescens*, *S. rubideae* i *S. plymuthica*, a njihova boja može varirati od tamno crvene do svetlo roze (Grimont i Grimont, 1978). Optimalni uslovi rasta za sve vrste roda *Serratia* je temperatura od 20 °C do 37 °C i pH vrednost sredine 9, ali je zanimljivo da proizvodnja pigmenta izostaje na temperaturi od 37 °C.

Prodigiozin ima antibakterijsku, antimalarijsku i antifungalnu aktivnost (Castro, 1967; Gerber, 1975). Takođe je poznato da ovi pigmenti imaju imunosupresivnu i antikancerogenu aktivnost (Manderville, 2001), kao i da pokazuju citotoksični efekat ćelijske linije kancera, ali ne i na zdrave ćelije (Khanafari *et al.*, 2006). Osim toga, dokazano je i da tumorske ćelije poreklom iz epitela gastrointestinalnog trakta ulaze u apoptozu pod dejstvom prodigiozina (Montaner *et al.*, 2000).

1.3.5. Ekstracelularni faktori virulencije *P. aeruginosa* i *S. marcescens*

1.3.5.1. Ekstracelularni faktori kod *P. aeruginosa*

Alginat. Alginat je ekstracelularni polisaharid koji je odgovoran za mukoidan izgled bakterijskih kolonija koje su rasle na hranljivom agaru. To je linearni kopolimer D-manuronske kiseline i L-glukonske kiseline koji se sintetiše nakon adhezije bakterija na čvrstu površinu.

Prekomerna sinteza alginata i mukoidan izgled posledica su mutacije u *mucA* genu, koji je negativni regulator produkcije alginata (Moradali *et al.*, 2017). Pod stresnim uslovima, kao što su manjak nutrijenata i visoka koncentracija soli, alginat se sintetiše u većoj količini. Alginat pruža fizičku barijeru fagocitima i stimuliše produkciju proinflamatornih citokina, uključujući IL-1, TNF- α i IL-8 (Govan i Deretic, 1996). Alginat takođe doprinosi toleranciji biofilmova, ali nije esencijalna komponenta za njihovo formiranje (Wozniak *et al.*, 2003).

Egzotoksin A. Egzotoksin A (ExoA) pripada familiji enzima adenozin difosfat (ADP)-ribosiltransferaze (Westman *et al.*, 2010). Sekretija ovog toksina je pod kontrolom LasI/LasR signalnog puta međubakterijske komunikacije, a indukovana je nedostatkom gvožđa. Prisustvo ovog virulentnog faktora dovodi do apoptoze (Morimoto i Bonavida, 1992) i nekroze ćelije domaćina (Plotkowski *et al.*, 2002). ExoA se vezuje za $\alpha 2$ makroglobulinski receptor eukariotskih ćelija, biva transportovan u citoplazmu ćelije, gde prevodi ADP-ribozu od NAD (nikotinamid adenin dinukleotid) do elongacionog faktora 2 što inhibira sintezu proteina i dovodi do ćelijske smrti (Wolf i Elsasser-Beile, 2009). Pored toga, posledice efekta ovog toksina su lokalna oštećenja tkiva, kolonizacija bakterija i negativan uticaj na imunološki sistem domaćina. Ovaj toksin utiče na imunološki sistem putem inhibicije proliferacije granulocita i makrofaga kao i remećenjem produkcije TNF- α leukocita i IL-1 (Staugas *et al.*, 1992).

Fosfolipaza C. Uloga lipaza i fosfolipaza je da razlažu fosfolipide ćelijske membrane domaćina kao i surfaktante (Kipnis *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* sintetiše jednu ili više homologih fosfolipaza C, koje su kodirane *plcH*, *plcN* i *plcB* genima. *In vivo* studije su pokazale da fosfolipaza C hidrolizuje fosfatidilholin i sfingomijelin što dovodi do nekroze tkiva i ćelijske smrti (Coutinho *et al.*, 1988). Hidroliza fosfatidilholina daje fosforilholin i diacilglicerol, koji mogu imati toksične efekte na ćelije (Westman *et al.*, 2010).

Proteaze. U proteaze spadaju enzimi sa proteolitičkom i elastaznom aktivnošću. Elastaze *P. aeruginosa* imaju proteolitičku i elastaznu aktivnost, s tim što je elastazna aktivnost značajna za patogenezu prilikom kolonizacije. *P. aeruginosa* sintetizira dva tipa elastaza, LasA i LasB, čija je sinteza pod kontrolom Las i Rhl signalnih puteva međubakterijske komunikacije (Toder *et al.*, 1991). Posledica dejstva LasB je krvarenje i curenje plazma komponenata (Komori *et al.*, 2001), kao i degradacija transferina, TNF- α , IL-2, IgG, IgA i drugih imunoloških faktora (Galloway, 1991).

Alkalna proteaza, kodirana genom *aprA* je cink metaloproteaza koja izaziva oštećenje tkiva domaćina i remeti imunološki sistem. Može da degraduje laminin, fibrin, fibrinogen, laktoferin, transferrin i proinflamatorne citokine (Parmely *et al.*, 1990).

Sekretorni sistem III tipa. Ovaj sekretorni sistem predstavlja proteinski kompleks koji transportuje citotoksine iz bakterijske ćelije u citoplazmu ćelije domaćina, kodiran je sa 36 različitih gena i predstavlja važan virulentni faktor patogeneze *P. aeruginosa* (Hauser, 2009). Direktni kontakt bakterijske ćelije i ćelije domaćina je signal za sekreciju četiri egzoenzima S, T, U i Y (ExoS, ExoT, ExoU i ExoY) pri čemu njihovo prisustvo varira među različitim sojevima *P. aeruginosa*. Ovi enzimi deluju sinergistički i utiču na povredu epitelijalne barijere domaćina, inhibiraju fagocitozu, što omogućava bakterijama da se slobodno replikuju i povećavaju gustinu populacije. Sekretorni sistem tipa III aktivan je samo u akutnim infekcijama.

Ramnolipidi. Ramnolipidi su prvi put opisani u literaturi 1949. godine kao produkti sekundarnog metabolizma *P. aeruginosa*, koji je esencijalni za preživljavanje bakterija u uslovima kada su dostupna samo ugljenična jedinjenja nerastvorna u vodi (Gong *et al.*, 2015; Muller *et al.*, 2011). To su amfifilna jedinjenja (poseduje hidrofилna i lipofilna svojstva) sastavljena od hidrofobnih lanaca masnih kiselina i jednog ili dva molekula ramnoze, koji predstavljaju hidrofилne komponente. Ramnolipidi imaju brojne funkcije – značajni su tokom procesa formiranja biofilmova, jer formiraju pore i kanale u ovoj strukturi (Davey *et al.*, 2003), a takođe je poznato da ramnolipidi učestvuju u disperziji biofilmova i da su esencijalni za kretanje rojenjem (Nickzad i Deziel, 2014; Wittgens *et al.*, 2017). Kao prirodni surfaktanti, ova jedinjenja smanjuju površinski napon tečnosti, po prirodi su emulgatori, što omogućava transport hidrofobnih supstanci (Beal i Betts, 2000). Takođe su biodegradibilni i predstavljaju jedinjenja niske toksičnosti (Santos *et al.*, 2016).

Postoji preko 60 opisanih ramnolipida, uključujući mono-ramnolipide i di-ramnolipide koji sadrže većinom dva, a nekad jedan ili pak tri molekula β -hidroksialkanoične kiseline sa različitom dužinom ugljeničnog niza (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Dva najčešća ramnolipida, produkta biosintetičkih puteva mikroorganizama, su ramnozil- β -hidroksidekanoil- β -hidroksidekanoat (Rha-C10-C10) mono-ramnolipid i ramnozil-ramnozil- β -hidroksidekanoil- β -hidroksidekanoat (Rha-Rha-C10-C10) di-ramnolipid (Soberon-Chavez *et al.*, 2005).

Ramnolipidi mogu biti virulentni faktori i to tako što učestvuju u distribuciji pojedinačnih ćelija iz biofilma radi dalje kolonizacije na drugim mestima (Davey *et al.*, 2003), a pružaju biofilmovima i protekciju od fagocita (Van Gennip *et al.*, 2009). Ramnolipidi deluju pozitivno na proces formiranja i na disperziju biofilмова. Poznato je da je potrebno prisustvo ramnolipida da bi se formirale mikrokolonije (Pamp i Tolker-Nielsen, 2007), međutim u slučaju deficita gvožđa ramnolipidi se sintetišu u većoj koncentraciji, što dovodi do aktiviranja kretanja grčanjem, onemogućavajući početno formiranje biofilma (Patriquin *et al.*, 2008).

Procesi biosinteze ramnolipida zavise od centralnih ćelijskih biohemijskih procesa, kao što su sinteza masnih kiselina i deoksitimidin difosfata (dTDP), i sinteze šećera. Biohemijski put sinteze ramnolipida se sastoji iz tri različite biohemijske reakcije.

Geni *rhlAB* i *rhlC* kodiraju sintezu svih neophodnih komponenti za ovaj biosintetski put. *RhlA* je odgovoran za sintezu β -hidroksi masnih kiselina i 3-(3-hidroksialkanoiloksi) alkanoične kiseline (HAA) (Deziel *et al.*, 2003). Membranska ramnoziltransferaza *RhlB* katalizuje reakciju sa dTDP-L-ramnozom i β -hidroksil masnom kiselinom, dajući monoramnolipide (Ochsner *et al.*, 1994). Ramnoziltransferaza *RhlC* katalizuje reakciju dodavanja molekula dTDP-L-ramnoze na monoramnolipide čime se formiraju di-ramnolipidi (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Delove biosintetskog puta ramnolipida isti su sa putevima sinteze lipopolisaharida (Rahim *et al.*, 2000), alginata (Olvera *et al.*, 1999) i 4-hidroksi-2-alkilhinolina (Bredenbruch *et al.*, 2005).

Regulacija procesa biosinteze ramnolipida je u direktnoj vezi sa procesom međubakterijske komunikacije, zavisna je od sredinskih uslova i produkcije polihidroksialkanoata i drugih važnih komponenti sinteze.

Transkripcioni aktivator međubakterijske komunikacije LasR, kada je u kompleksu sa 3-oxo-C12-HSL autoinducerom, pokreće ekspresiju brojnih gena regulisanih ovim sisemom, a aktiviraju i drugi transkripcioni regulator međubakterijske komunikacije, RhlR. RhlR vezan za autoinducer C4-HSL utiče na ekspresiju *rhlAB* (Ochsner *et al.*, 1994) i *rhlC* (Rahim *et al.*, 2001), a ukoliko je RhlR u slobodnoj formi tada inhibira transkripciju *rhlAB* gena (Medina, Juarez, Soberon-Chavez, 2003). Transkripciona regulacija gena za ramnolipide ne zavisi samo od RhlR sistema međubakterijske komunikacije, već i sigma faktor RpoS parcijalno reguliše ekspresiju operona *rhlAB* (Medina, Juarez, Soberon-Chavez, 2003). Mutanti u *pqsR* i *pqsE* genima pokazali su znatno smanjenje u produkciji ramnolipida što je ukazalo da PqsR, odnosno PQS sistem imaju direktnu ulogu u biosintezi ramnolipida (Medina, Juarez, Valderrama, *et al.*, 2003).

1.3.5.2. Ekstracelularni faktori kod *S. marcescens*

Proteaze. Vrste familije Enterobacteriaceae obično ne sekretuju proteine u spoljašnju sredinu, pa sekretovani proteini ostaju ili u periplazmatičnom prostoru ili su čvrsto integrisani u spoljašnjoj membrani ćelije. Izuzetak od ovog pravila je sekretovanje proteaza vrste *S. marcescens* (Schmitz i Braun, 1985). Od kada je izolovana i okarakterisana prva proteaze iz *S. marcescens* 1968. godine (Cruz-Camarillo i de Cruz, 1968), otkriveno je da ova vrsta može sintetisati brojne proteaze u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine, a metaloproteaze sa visokom specifičnošću dejstva su najznačajnije za virulentnost ovog soja (Lyerly i Kreger, 1979). Metaloproteaze *S. marcescens* mogu direktno izazvati oštećenja tkiva domaćina, ili uticati na oslobađanje enzima koji degraduju tkiva (Lyerly i Kreger, 1979).

Nukleaza. Većina bakterijskih vrsta sintetiše dva tipa nukleaza, dezoksiribonukleaze i ribonukleaze. Kod *S. marcescens* nije potvrđeno prisustvo dva tipa nukleaza, već ova vrsta sintetiše nespecifičnu fosfodiesterazu koja može degradovati oba tipa molekula i to u odsustvu neorganskih fosfata (Eaves i Jeffries, 1963). Fosfodiesterazu *S. marcescens* veličine 26 kDa kodira gen *nucA*, a transkripcija se intenzivira sa porastom gustine populacije (Benedik i Strych, 1998).

U poređenju sa drugim nukleazama ovaj enzim ima visoku katalitičku efikasnost, delujući podjednako efikasno na dvostruki heliks dezoksiribonukleinske kiseline kao i na lanac ribonukleinske kiseline, sve dok supstrat ima ne manje od pet fosfatnih ostataka (Benedik i Strych, 1998). *In vitro* studije su pokazale da ova nukleaza preferira CG bogate regione u odnosu na AT bogate regione, kao DNAza I (Meiss *et al.*, 1995).

Hemolitička i citolitička aktivnost *S. marcescens*. Postoji više tipova hemolizina/citolizina, a jedan od njih je grupa toksina koji formiraju pore u ćelijskoj membrani. Ovi toksini su obično integrisani u ćelijsku membranu u formi monomera ili oligomera, čime menjaju permeabilnost membrane i dovode do ćelijske smrti. Citotoksini dovode do pucanja i hemolize eritrocita, što vodi oslobađanju inflamatornih medijatora leukotriena i histamina leukocita. U sintezu hemolizina uključeni su geni *shlA* i *shlB* kod *S. marcescens* (Walker *et al.*, 2004). Ekspresijom gena *shlB* sintetiše se ShlB protein, koji utiče na sintezu ShlA toksina. ShlB protein, pored toga što sekretuje ShlA toksin, on ga i konvertuje u hemolizin (Schiebel *et al.*, 1989). Ovi toksini ostvaruju svoje dejstvo remećenjem sinteze ATP molekula.

1.3.6. Biofilm

Dugo se smatralo da je planktonski način života dominantna forma u kojoj bakterije nastanjuju različite sredine. Međutim, planktonski način života je samo faza kroz koju bakterije prolaze da bi došle do stadijuma u kom provode najveći deo svog životnog ciklusa, do forme biofilma. Biofilm predstavlja zajednicu mikroorganizama, uronjenu u polisaharidni matriks koji proizvode same ćelije i koji štiti populaciju od nepovoljnih uslova sredine.

Forma biofilma zapažena je još 1684. godine, kada je Anton van Levenhuk objavio skice agregata mikroorganizama (tada zvanih „animalikusa”) prikupljenih sa zubnih plaka. Prvi dokaz o „grupacijama bakterija” dolazi tek 1933. godine kada je uočen fenomen da bakterije u slatkoj vodi rastu u vidu slojeva (Henrici, 1933) dok su prvi dokazi o postojanju multicelularnih agregata *P. aeruginosa* kod pacijenata sa cističnom fibrozom objavljeni 1977. godine (Hoiby, 1977).

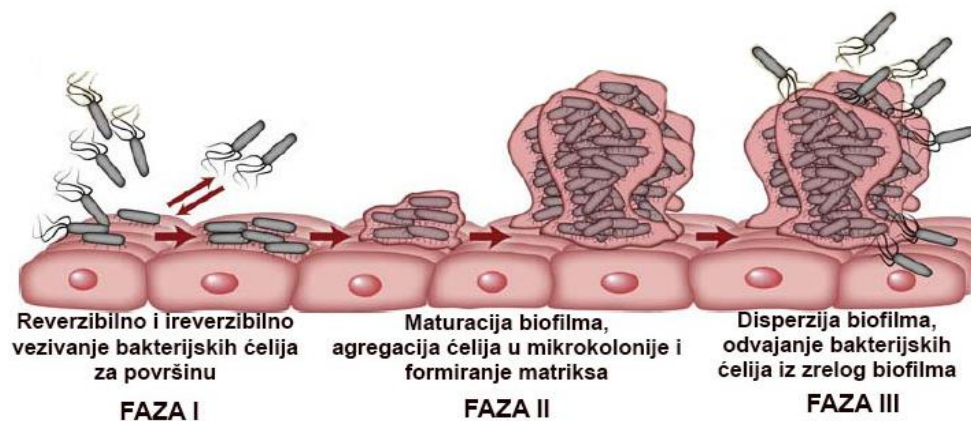
Biofilm, kao termin, javlja se po prvi put u literaturi 1981. godine, kada je definisan kao agregat sesilnih mikroorganizama (McCoy *et al.*, 1981). Tada je publikovano i to da je biofilm predominantna forma života mikroorganizama, a ne planktonska forma, kako se do tada smatralo (Costerton *et al.*, 1987).

Prednosti koje pruža život u zajednici biofilma je 1) specifična mikrosredina u kojoj su povoljni sredinski uslovi i olakšana međubakterijska komunikacija, 2) pojedinačne bakterije su zaštićene od predatorskih organizama i antimikrobijalnih jedinjenja, 3) život u formi biofilma omogućava zajednici povećanu toleranciju na antibiotike, a i 4) biofilmovi su pogodna niša za razmenjivanje naslednih informacija horizontalnim genskim transferom (Donlan, 2002).

Formiranje biofilmova svih bakterijskih vrsta dešava se u nekoliko faza nakon čega nastaju zreli biofilmovi, kompleksne trodimenzionalne strukture koje u sebi imaju više mikrosredina sa različitim uslovima osmolarnosti, različitom dostupnošću hranljivih materija kao i različite gustine populacije. Ovakva heterogenost implicira da ne postoji jedinstven fenotip biofilma unutar vrste, a pogotovo ne između vrsta kao i unutar mešovityh biofilmova koje čini više vrsta, a koji su česta pojava u prirodi (Fux *et al.*, 2005).

1.3.6.1. Proces formiranja biofilmova

Formiranje biofilmova se odvija u nekoliko faza: 1) adhezija bakterija za podlogu, 2) sazrevanje odnosno maturacija biofilma i 3) disperzija ćelija iz biofilma (Kostakioti *et al.*, 2013) (Slika 6).



Slika 6. Šematski prikaz formiranja biofilma u fazama. (Preuzeto i modifikovano iz publikacije Kostakioti *et al.*, 2013)

Faza 1 - Adhezija bakterija za podlogu. Inicijalni korak u formiranju biofilmova je delom i stohastički proces, iako neki geni kao i različite bakterijske strukture učestvuju u procesu adhezije (Donlan, 2002).

Ćelijske strukture koje omogućavaju bakterijama kretanje, flagele i pili, značajne su za ovaj prvi korak kod nekih bakterijskih vrsta, iako odsustvo flagela ne utiče na formiranje biofilma (Klausen *et al.*, 2003). Adhezini su važni faktori koji doprinose ovom inicijalnom koraku, kao i antigen 43 (Kostakioti *et al.*, 2013). Geni koji su uključeni u ovaj proces, odgovorni za sintezu adhezina su *algC*, *algD*, *algU* i *rpoS* kao i geni uključeni u sintezu polifosfokinaza (Pulcini, 2001). Vezivanje bakterija za podlogu može biti reverzibilno i ireverzibilno. Kada se ćelije ireverzibilno vežu, tada može otpočeti druga faza formiranja biofilma.

Faza 2 - Maturacija biofilma. Glavni regulator vezivanja ćelija za podlogu i otpočinjanja formiranja mikrokolonija je SadB protein (Caiazza i O'Toole, 2004). On takođe predstavlja signal za ekspresiju gena i regulatornih faktora uključenih u sintezu komponenti ekstracelularnog matriksa biofilma. Kod *P. aeruginosa* komponente matriksa variraju u zavisnosti od sredinskih uslova, odnosno dostupnosti nutrijenata (Harmsen *et al.*, 2010). Zreo biofilm ima kompleksnu mrežu matriksa sa gustom populacijom bakterija u njemu. U različitim delovima biofilma bakterijske populacije imaju različite fenotipe, poput prisustva, odnosno odsustva flagele.

Faza 3 - Disperzija/rasejavanje biofilma. Pored toga što je disperzija posledica mehaničkih sila ili stresnih sredinskih uslova, isto tako može biti fino regulisan proces. Senzorni sistemi prate koncentraciju malih signalnih molekula u skladu sa promenama u spoljašnjoj sredini i utiču na ekspresiju gena kojima se reguliše disperzija biofilma. Disperzija kao fino regulisani proces dešava se u finalnim stadijumima razvoja biofilma, kada bakterijske ćelije aktivno plivaju izvan forme biofilma i iniciraju kolonizaciju na drugom mestu. Ovaj proces obično otpočinje u periodu od tri do dvanaest dana nakon inicijalne faze adhezije, ali je disperzija proces koji zavisi od veličine i starosti mikrokolija (S.-K. Kim i Lee, 2016).

1.3.6.2. Karakteristike biofilma kod *P. aeruginosa*

Proces formiranja biofilma najbolje je izučen i objašnjen kod vrste *P. aeruginosa*. Kada se prva ćelija „zakači“ za podlogu ona se, u početnoj fazi, kreće po podlozi grčenjem ili pak ostaje na istom mestu te oko nje počinje da se formira biofilm. Kada se formira mikrokolonija, ona se okružuje matriksom koga sačinjavaju polisaharidi, proteini i DNK molekuli, čime je kolonija zaštićena od spoljašnjih uticaja (Harmsen *et al.*, 2010).

Kako mikrokolonije sazrevaju, formiraju se i delovi biofilma u kojima su ćelije pokretne i koje pri rasturanju matriksa, mogu da se oslobode. *P. aeruginosa* može da sintetiše tri različita polisaharida koji ulaze u sastav matriksa: Pel, Psl i alginat, mada je pokazano da su Pel i Psl uglavnom sintetisani u inicijalnoj fazi formiranja biofilma, a alginat u kasnijim fazama sazrevanja biofilma, što odgovara hroničnim infekcijama (Wozniak *et al.*, 2003).

Prilikom adaptiranja na sredinske uslove moguća je pojava ponovnog aktiviranja gena za biosintezu alginata što vodi do povećane produkcije alginata i formiranja mukoidnih fenotipova (Boucher *et al.*, 1997). Psl je polisaharid bogat manozom i galaktozom, koji učestvuje u procesu pričvršćivanja kolonija za biotičku ili abiotičku površinu (Rybtke *et al.*, 2015). Pel polisaharid obično nije uključen u proces pričvršćivanja biofilma za podlogu, ali u odsustvu Psl može imati tu funkciju. Nove ćelije se priključuju biofilmu tako što se površinski adhezini ćelija CdrA (koji su potrebni za Psl posredovanu međućelijsku adheziju) vezuju za polisaharide matriksa (Borlee *et al.*, 2010).

U sastav matriksa, pored polisaharida, ulaze i ekstracelularna DNK (eDNK), koja vodi poreklo iz liziranih ćelija malih subpopulacija bakterija (Allesen-Holm *et al.*, 2006) ili iz membranskih vezikula (Harmsen *et al.*, 2010). Ekstracelularna DNK može da formira kompleks sa Psl polisaharidima i takve strukture predstavljaju glavni skelet biofilma (Wang *et al.*, 2015). Ovakve strukture jačaju integritet biofilma i čine ih otpornim na aktivnost enzima DNAaza. U biofilmovima *P. aeruginosa* mogu se naći i pili tipa IV, CdrA adhezini, LecB lectin i Fap amiloid, koji mogu imati različite funkcije, kao što su formiranje biofilma, vezivanje za supstrat, vezivanje za eDNK (Rybtke *et al.*, 2015).

Proces formiranja biofilma je regulisan ekspresijom brojnih gena kao i stohastičkim procesima. Sekundarni signalni glasnik, c-di-GMP, je odgovoran za početak formiranja biofilma, tačnije za prelazak iz planktonske forme u stacionarnu, odnosno za pričvršćivanje bakterija/kolonija za supstrat tj. površinu (Fazli *et al.*, 2014). Vezujući se za različite efektorne protein c-di-GMP učestvuje u regulaciji na transkripcionom, translacionom i post-translacionom nivou. Ovaj signalni molekul reguliše proces produkcije komponenti matriksa, adhezina i flagela, a pored toga je uključen i u kontrolu biosinteze alginata, Psl i Pel.

U hroničnim infekcijama kod cistične fibroze bakterije se prilagođavaju adaptivnim mutacijama koje rezultuju povećanom sintezom signalnog molekula, što dovodi do prekomerne produkcije Psl, Pel i alginata i samim tim do povećanja rezistencije na antibiotike (Rybtke *et al.*, 2015).

Za regulaciju formiranja biofilmova je odgovorna i međubakterijska komunikacija. Uloga međubakterijske komunikacije u procesu formiranja biofilmova prvi put je opisana 1998. godine. Tada je pokazano da *lasI* mutant *P. aeruginosa* formira samo ravne i nedefinisane biofilmove (Davies *et al.*, 1998). Rhl reguliše produkciju ramnolipida, koji su važan faktor prilikom formiranja biofilmova, oni oblikuju strukturu biofilma i imaju ulogu u disperziji biofilmova (Patriquin *et al.*, 2008). PQS signalni put reguliše otpuštanje ekstracelularne DNK prilikom formiranja biofilmova kao i produkciju membranskih vezikula (Yang *et al.*, 2009).

1.3.6.3. Karakteristike biofilmova kod *S. marcescens*

S. marcescens često formira biofilmove na kateterima i drugim medicinskim pomagalicama. Adhezija za površinu kod ove vrste zavisi od prisustva kratkih, tankih struktura fimbrija (filamentoznih hemaglutina) (Adegbola i Old, 1982). Fimbrije omogućavaju kolonizaciju epitelijalnih ćelija urinarnog trakta (Hejazi i Falkiner, 1997), dok su flagele i pili oni koji omogućavaju plivanje i rojenje i esencijalni su za inicijalnu fazu adhezije prilikom formiranja biofilmova u urinarnom traktu (Salini i Pandian, 2015). Produkt gena *bsmA* je adhezina nepoznatog tipa koji kontroliše veličinu ćelijskih agregata, dok *bsmB* gen aktivira proces agregacije ćelija u početnoj fazi formiranja biofilma (Van Houdt *et al.*, 2007).

Proces formiranja biofilmova parcijalno je regulisan međubakterijskom komunikacijom. SwrI mutant *S. marcescens* koji nema mogućnost sinteze C4-HSL i C6-HSL autoinducera formira tanke biofilmove u kojima ćelije ne agregiraju i ne formiraju karakterističnu strukturu (Rice *et al.*, 2005).

1.4. Lečenje bakterijskih infekcija – problem rezistencije na antibiotike

Otkriće antibiotika je jedan od najvažnijih momenata u savremenoj medicini. Na samom početku njihove primene uspešnost lečenja bakterijskih infekcija bila je stopostotna (Penesyan *et al.*, 2015). Međutim, ubrzo se pojavio problem rezistencije na antibiotke koju su mikroorganizmi razvijali na različite klase antibiotika (Ventola, 2015a, 2015b).

Nažalost, trend pojave i širenje rezistencije na antibiotike postoji i danas, što predstavlja realnu pretnju na globalnom nivou u slučaju da se ne ustanovi novi način borbe protiv patogenih bakterija. Istraživanja ukazuju na to da se geni odgovorni za rezistenciju prenose unutar jedne odnosno različitih vrsta već milenijumima unazad (D'Costa *et al.*, 2011), što ukazuje da je rezistencija prirodni fenomen. Međutim, usled selektivnog pritiska javlja se stečena rezistencija, posledica mutacija (Munita i Arias, 2016; Penesyan *et al.*, 2015).

Istorijski gledano, potraga za antibioticima bila je fokusirana na slobodnoživuće bakterije, što je dovelo do razvoja/otkrića antibiotika koji deluju na pojedinačne bakterijske ćelije (Penesyan *et al.*, 2015). Shodno tome, većina istraživanja o mehanizmima rezistencije na antibiotike se bavila izučavanjem tolerancije na nivou ćelija (Blair *et al.*, 2015; J. L. Martinez *et al.*, 2009). Razvoj, odnosno pojava rezistencije se javlja kao rezultat mutacija u genima koji su često povezani sa mehanizmom delovanja jedinjenja, tj. antibiotika ili se geni koji su odgovorni za rezistenciju stiču horizontalnim genskim transferom. Uopšteno gledano, mutacije koje dovode do antibiotske rezistencije utiču na delovanje antibiotika preko 1) modifikacije antimikrobnog jedinjenja, 2) sprečavanja antimikrobnog jedinjenja da dostigne ciljno mesto delovanja, i 3) modifikacija i/ili zaobilazanja ciljnih mesta delovanja (Blair *et al.*, 2015; Munita i Arias, 2016; Penesyan *et al.*, 2015). Međutim, odavno je prepoznato da i drugi mehanizmi mogu pomoći bakterijama da prežive izloženost antibioticima. Tako bakterije koje ne rastu, odnosno sporo rastu mogu izbeći baktericidno delovanje antibiotika koji zahtevaju aktivan rast da bi delovali. Ova osobina, nazvana tolerancija, je sposobnost preživljavanja pod tretmanom bez razvoja rezistencije (Levin-Reisman *et al.*, 2017).

Iako se bakterije obično smatraju slobodnoživućim jednoćelijskim organizmima, sesilna forma života, biofilm, danas se smatra dominantnim načinom života mikroorganizama u prirodi. Prema podacima Nacionalnog instituta za zdravlje Sjedinjenih Američkih Država, više od 75% infekcija ljudi izazvanih mikroorganizmima su posledica formiranja i postojanosti biofilmova (Miquel *et al.*, 2016). Bakterijski biofilmovi česti su pratioci mnogih hroničnih infekcija tkiva kao što su one koje se javljaju u plućima pacijenata obolelih od cistične fibroze ili u hroničnim ranama, a takođe su kontaminanti medicinskih pomagala, katetera ili protetika. Postoji nekoliko ključnih karakteristika po kojima se razlikuju ćelije u sklopu biofilma od planktonskih, ali verovatno najrelevantnija činjenica da su sesilne ćelije u sklopu biofilma daleko manje osetljive na antimikrobne agense nego njihovi genetski identični ekvivalenti u planktonskoj formi (Hall i Mah, 2017). Ćelije biofilma mogu biti 10 do 1000 puta manje podložne antibakterijskim agensima u poređenju sa njihovim slobodnoživućim ekvivalentima (Balcazar *et al.*, 2015). Povećana tolerantnost biofilma na antibiotike otežava lečenje infekcija.

Biofilmovi u ranoj fazi nastanka se mogu efikasno tretirati odgovarajućom terapijom, ukoliko se dijagnoza postavi na samom početku infekcije. Međutim, postavljanje rane dijagnoze nije čest slučaj zbog odsustva simptoma koji prate infekciju, pa lečenje postaje otežano usled pojave biofilmova koji su otporni na terapiju. Preventivna terapija antibioticima se koristi samo u slučajevima kada postoji realna opasnost od nastanka infekcija, pre i nakon operacija kao i ugradnje implanata i katetera. Inhibicija formiranja biofilmova se može postići odgovarajućom terapijom koja: 1. onemogućava adheziju bakterija za površinu, 2. moduliše međubakterijsku komunikaciju, 3. utiče na regulatorne mehanizme (Christensen *et al.*, 2013) ili 4. rastura formirani biofilm (Parrino *et al.*, 2019).

Na žalost, često se preventivne mere ne sprovedu na vreme, pa se već formirani biofilm mora odstranjivati hiruškim putem, ukoliko postoji mogućnost za takav pristup, a ukoliko ne postoji, onda je potrebno uticati na strukturu biofilma terapeutima koji ga mogu oslabiti ili rasturiti. Takav efekat mogu proizvesti molekuli poput surfaktanata koji utiču na adhezivne sposobnosti ćelija i samim tim na maturaciju biofilma, mali molekuli koji mogu inhibirati sintezu egzopolisaharida (van Tilburg Bernardes *et al.*, 2017), enzimi koji mogu degradovati komponente matriksa biofilma npr.

DNaze koje seku eDNK, glikozidne hidrolaze koje utiču na polisaharide matriksa i alginatne liaze koje utiču na alginat u mukoidnim biofilmovima (Koo *et al.*, 2017) ili pak jedinjenja koja utiču na nivo cikličnog di-GMP-a, signalnog sistema koji između ostalih utiče na prelazak iz planktonskog u sesilni način života bakterija (Ma *et al.*, 2011; Valentini i Filloux, 2016). Primenom efikasne terapije, koja rasturi formirani biofilm, mogu se otkloniti zaostale ćelije iz takve zajednice i to antibioticima ili imunološkim odgovorom domaćina.

Generalno, prepoznato je da je osnova za rezistenciju na antibiotike i toleranciju ćelija u biofilmu multifaktorijalna te da se ovi mehanizmi razlikuju u zavisnosti od specifičnosti antibakterijskog agensa, bakterijskih vrsta i sojeva, faze razvoja biofilma kao i uslova rasta, odnosno spoljašnjih faktora (Hall i Mah, 2017). Za razliku od mehanizama koji dovode do rezistencije na antibiotike i tolerancije na nivou pojedinačnih ćelija koji su detaljno istraženi, brojna pitanja koja se odnose na mehanizme rezistencije ćelija u biofilmova su još uvek bez odgovora. Neki od ćelijskih mehanizama koji su odgovorni za rezistenciju biofilma na antimikrobne agense uključuju efluks pumpe i β -laktamaze u matriksu, dok su smanjena stopa rasta populacija unutar biofilma, perzistencija i mehanizmi koji kontrolišu/regulišu oksidativni stres izazvan antibioticima, prepoznati kao mehanizmi tolerancije (Hall i Mah, 2017; Olsen, 2015). Smanjenje neadekvatnog korišćenja antibiotika može da pomogne da se ovaj proces uspori, ali ga zasigurno ne može zaustaviti. Stoga je uvođenje novih terapijskih opcija za borbu protiv bakterijskih infekcija postalo prioritet na svetskom nivou. Uprkos rastućoj potrebi za novim i efikasnijim antibioticima, razvoj novih klasa ovih terapeutika zaostaje daleko za našim očekivanjima, jer se rad na otkrivanju novih antibiotika odavno ne smatra ekonomski mudrom investicijom, sa stanovišta farmaceutske industrije.

U poslednjih 30 godina nije otkrivena nijedna nova klasa antibiotika i svaki trenutno dostupan antibiotik je derivat starije generacije antibiotika koji deluju poznatim mehanizmom (Silver, 2011). Infekcije izazvane multirezistentnim sojevima se danas leče različitim kombinacijama antibiotika, pa istraživanja idu u pravcu pronalaska najefikasnije kombinacije i doze antibiotika kako bi se povećala uspešnost lečenja (Rahal, 2006).

Pored toga, istraživanja idu i u pravcu identifikacije farmakološki aktivnih jedinjenja koja se nazivaju adjuvansi ili potencijatori, koji se mogu kombinovati sa antibioticima da bi se povećala ili obnovila njihova aktivnost, pri čemu sami adjuvanti ne pokazuju antibakterijsku aktivnost (Wright, 2016).

1.4.1 Alternativne strategije u lečenju infekcija izazvanih vrstama *P. aeruginosa* i *S. marcescens*

Primenom terapeutika koji utiču na vitalne funkcije mikroorganizama, npr. antibioticima, vrši se selektivni pritisak koji dovodi do pojave rezistencije. Obećavajuća alternativna strategija klasičnom antibiotskom pristupu poznata je kao anti-virulentna terapija koja ne utiče na bakterijski rast ili vijabilnost ćelija, već deluje na proizvodnju faktora virulencije čime se smanjuje patogeni potencijal bakterija.

Shodno tome, potencijalne mete za razvoj anti-virulentnih agenasa su brojni faktori virulencije kao što su adhezija bakterija koja prethodi formiranju biofilмова i sekretorni sistemi, svi regulisani sistemima međubakterijske komunikacije (Rasko i Sperandio, 2010).

Pored proširivanja repertoara ciljnih struktura, ostale prednosti alternativnog pristupa su smanjenje selektivnog pritiska na bakterije čime se umanjuje mogućnost pojave rezistencije, a takođe se i povećava specifičnost delovanja terapeutika pa ne dolazi do narušavanja strukture mikroflore domaćina (Ruer *et al.*, 2015).

Primena različitih jedinjenja za modifikaciju regulatorne mreže međubakterijske komunikacije prvi put je opisana pre 19 godina, i to otkrićem enzima koji degraduje autoinducere laktonske prirode kod *Erwinia carotovora* (Dong *et al.*, 2000). Postoji više načina kako jedinjenja mogu uticati/remetiti signalni put međubakterijske komunikacije, a mehanizam delovanja se razlikuje od jedinjenja do jedinjenja. Takođe, savremeni hemijski pristupi promovišu racionalni dizajn lekova koji omogućava dodatnu eksploataciju različitih struktura prirodnih i sintetičkih bioaktivnih molekula.

Kombinovana terapija, koja podrazumeva sinergističko dejstvo jedinjenja koja utiču na bakterijsku komunikaciju zajedno sa antibioticima može biti dobra strategija u lečenju infekcija.

Modulacija puteva međubakterijske komunikacije: Inhibicija virulencije modifikacijom međubakterijske komunikacije može se ostvariti putem: inhibicije sinteze autoinducera; inaktiviranjem autoinducera (npr. enzimatskom reakcijom – laktonaze, acilaze ili oksidoreduktaze) ili putem kompeticije prilikom vezivanja za receptor.

Dok AHL kratkog lanca i PQS autoinduceri slobodno difunduju kroz membranu, AHL molekuli dugih lanaca i HHQ transportuju se pomoću efluks pumpi ili membranskim vezikulama (Lamarche i Deziel, 2011; Pearson *et al.*, 1999). Inhibicija puteva međubakterijske komunikacije se može ostvariti inaktivacijom enzima koji učestvuju u sintezi autoinducera ili onemogućavanjem njihovog transporta inaktivacijom efluks pumpi. Sintaza AHL se može onemogućiti inhibicijom sinteze prekursora tj. SAM molekula. Do sada najmanje istražen put inhibicije je uticaj na produkciju AHL autoinducera.

Inaktivacija autoinducera se može postići degradacijom signalnih molekula ili aktivnošću antitela (Rasmussen i Givskov, 2006). Laktoliza autoinducera ostvaruje se u sredinama u kojima je pH vrednost viša od 7, a takođe i visoka temperatura utiče na otvaranje laktonskog prstena, ali samo AHL molekula čiji bočni lanci imaju više od četiri ugljenikovih atoma (Yates *et al.*, 2002).

Enzimi koji mogu degradovati AHL molekule su laktonaze, acilaze i oksidoreduktaze. Laktonaze hidrolizuju estarske veze laktonskog prstena (Dong *et al.*, 2002). Međutim, u kiselim sredinama tako otvoren prsten AHL molekula može spontano da se zatvori. Acilaze nereverzibilno hidrolizuju acil-amidnu vezu između acilnog niza i laktonskog prstena (Lin *et al.*, 2003). Oksidoreduktaze oksiduju ili redukuju acilni niz, i ovaj tip reakcije je najmanje proučen u kontekstu inhibiranja međubakterijske komunikacije. Dioksidogenaze hidrolizuju PQS molekule u N-oktanoil antranilnu kiselinu (Pustelny *et al.*, 2009).

Geni koji kodiraju sintezu PQS autoinducera su locirani na *pqsABCD* operonu (Heeb *et al.*, 2011). Inaktivacija PqsA, PqsB ili PqsD potpuno inhibira sintezu HHQ i PQS molekula kod *P. aeruginosa*, kao i ekspresiju virulentnih faktora koji su pod kontrolom PQS sistema međubakterijske komunikacije.

PqsA konvertuje antranilnu kiselinu do antranilol-koenzima A koji zajedno sa malonil-koenzimom A formira 2-aminobenzoilacetil-koenzim A (2-ABA-CoA) u reakciji koju katalizuje PqsD.

PqsE svojom tioesteraznom aktivnošću konvertuje 2-ABA-CoA u 2-aminobenzoil acetata (2-ABA). Kondenzacijom oktanoil-koenzima A i 2-ABA u prisustvu heterodimera PqsBC formira se HHQ. Pod aerobnim uslovima, monoksigenaza PqsH hidroksilizuje ugljenikov atom na poziciji 3' HHQ molekula u finalnom koraku biosinteze PQS molekula (Heeb *et al.*, 2011). PqsL monoksigenaza, zajedno sa produktima *pqsABCD* gena učestvuju u sintezi 2-heptil-4-hidroksihinolin N-oksida (HQNO) i drugih N-oksida.

Još jedan od načina inhibiranja međubakterijske komunikacije je putem blokiranja receptra za autoinducere. Brojni analozi prirodnih signalnih molekula mogu remetiti signalni put vezivanjem za odgovarajući receptor čime onemogućavaju vezivanje prirodnih signalnih molekula. Dizajn molekula koji potencijalno mogu blokirati receptor se vrši racionalnim modifikacijom poznatih struktura sa različitim hemijskim grupama ili se pretražuju biblioteke različitih hemijskih jedinjenja. Čak i male strukturne razlike mogu dovesti do blokade receptora. Svakako veliki broj studija odnosa strukture i aktivnosti i molekularnog modelovanja vršeno je u cilju otkrića molekula sa inhibitornom aktivnošću na međubakterijsku komunikaciju (LaSarre i Federle, 2013).

1.4.2. Jedinjenja prirodnog porekla sa anti-virulentnim aktivnostima

U potrazi za strukturno novim antimikrobnim agensima biljke i zemljišni mikroorganizmi predstavljaju neiscrpan prirodan izvor novih hemijskih struktura. Zbog svoje specifične stereochemije i velikog diverziteta farmakofora jedinjenja prirodnog porekla mogu delovati na brojne receptore na ćeliji i uticati na veliki broj metaboličkih puteva, za razliku od hemijski sintetisanih jedinjenja koja imaju užu dijapazon dejstva (Drewry i Macarron, 2010). Osim toga, bakterije ređe postaju rezistentne na prirodna jedinjenja usled sličnosti sa metabolitima koje proizvodi sam organizam (Hert *et al.*, 2009).

Otkriće strukturno novih prirodnih molekula je dugotrajan proces, što pokazuje i podatak da je u periodu od 1981. do 2010. godine od ukupnog broja uvedenih lekova samo 34% bilo prirodnog porekla (Newman i Cragg, 2012). Za identifikaciju strukturno novog molekula potrebno je pretražiti ogroman broj uzoraka, nekada i više hiljada, pri čemu se često nailazi na problem ponovnog otkrivanja već poznatih jedinjenja (Drewry i Macarron, 2010).

Prirodni inhibitori međubakterijske komunikacije: DL-homoserin tiolakton, ekstrahovan iz marinske vrste *Staphylococcus hominis*, po strukturi je veoma sličan homoserin laktonu i pokazuje inhibitorni efekat na međubakterijsku komunikaciju brojnih bakterijskih vrsta (McInnis i Blackwell, 2011).

Terein ekstrahovan iz gljive *Aspergillus terreus* utiče na produkciju elastaza, ramnolipida i piocijanina *P. aeruginosa*, delovanjem na nivou transkripcije gena koji regulišu međubakterijsku komunikaciju (B. Kim *et al.*, 2018). Terein utiče na nivo celularnog c-di-GMP koji ima značajnu ulogu u prelazu bakterija iz planktonskog načina života u formu biofilma. Smatra se da terein blokira receptore međubakterijske komunikacije, LasR i RhlR.

Aktivno jedinjenje dobijeno iz mirođije (*Anethum graveolens*) utiče na formiranje biofilma *S. marcescens* remećenjem ekspresije gena kontrolisanih procesom međubakterijske komunikacije *fimC*, *bsmA* i *flhD* koji su ključni u inicijalnoj fazi formiranja biofilma (Salini i Pandian, 2015).

Tri različita ekstrakta lista biljke vodeni kesten (*Trapa natans*), pokazala su inhibitornu aktivnost na bakterijsku komunikaciju i formiranje biofilma kod *P. aeruginosa*. Ekstrakti *T. natans* inhibiraju proizvodnju piocijanina i elastaze putem modulacije Las i Pqs signalnih puteva kod vrste *P. aeruginosa* (Aleksic *et al.*, 2018).

Esencijalna ulja citrusnih vrsta pokazuju inhibitorno dejstvo na AHL-zavisnu međubakterijsku komunikaciju kod *P. aeruginosa*, inhibirajući produkciju piocijanina i formiranje biofilma. Ova ulja pokazuju inhibitorno dejstvo i na mešovite biofilme koje formiraju *P. aeruginosa* i neke medicinski značajne gljive, kao što su *C. albicans* i *Aspergillus fumigatus* (Pekmezovic *et al.*, 2016).

1.4.3. Hemijski sintetisana jedinjenja sa anti-virulentnom aktivnošću

Hemijski sintetisana jedinjenja sa antimikrobnim aktivnostima obično se dizajniraju po ugledu na već postojeća aktivna jedinjenja, uglavnom antibiotike ili druge poznate anti-virulentne agense, tako da su biblioteke sintetisanih jedinjenja najčešće derivati poznatih bioaktivnih jedinjenja čije su strukture modifikovane u smeru dobijanja izraženije biološke aktivnosti i/ili u smeru smanjenja njihove toksičnosti prema humanim ćelijama.

Antimikrobijalni peptidi su do sada najpoznatija i najaktivnija jedinjenja koja uspešno remete formiranje biofimova različitih vrsta Gram-pozitivnih i Gram-negativnih patogenih. Ova jedinjenja, koja se sintetišu kao prvi odgovor imunološkog sistema domaćina nakon bakterijske infekcije, narušavaju integritet membrane bakterijske ćelije što rezultuje lizom i ćelijskom smrću (Hoque *et al.*, 2015). Glavni izazov u dizajniranju i sintezi sintetičkog derivata antimikrobijalnih peptida je postizanje selektivnosti prema bakterijskoj membrani, a da se pri tome izbegne citotoksični efekat prema humanim ćelijama.

Modifikacijom lipidnog kraja lipopeptida tridekaptina A dobijen je strukturni analog sa antibakterijskom aktivnošću prema *Escherichia coli* O157:H7 i multirezistentnoj *Klebsiella pneumoniae* (Cochrane *et al.*, 2014). Hok i saradnici su sintetisali mali molekul dvostrukim pozitivnim naelektrisanjem, dva lipofilna lanca i četiri nepeptidne amidne veze derivatizovanjem diaminoalkana. Ovaj sintetički molekul je pokazao jaku antibakterijsku aktivnost prema sojevima *Staphylococcus aureus* MRSA, *Enterococcus faecium* rezistentnom na vankomicin i prema soju *K. pneumoniae* rezistentnom na β -laktamske antibiotike (Hoque *et al.*, 2015).

Analozi nativnih autoinducera mogu biti izuzetno potentni anti-virulentni agensi. Pored strukturnih analoga HSL koji su najčešći signalni molekuli međubakterijske komunikacije brojnih bakterijskih sojeva i analoga hinolina koji su autoinduceri PQS signalnog puta kod *P. aeruginosa*, diketopiperazini (DKP) su jedinjenja slične strukturne konformacije kao i signalni molekuli, i kao takvi mogu uticati na bakterijsku komunikaciju. Iako je poznato da DKP mogu uticati na međubakterijsku komunikaciju brojnih bakterijskih vrsta, do sada nije poznato da li su oni prirodni signalni molekuli međubakterijske komunikacije ili samo imaju takav efekat zbog sličnosti u konformaciji sa autoinducerima (Holden *et al.*, 1999).

1.4.3.1. Analozi homoserin laktona

Analozi nativnih signalnih molekula međubakterijske komunikacije se dobijaju ili racionalnim dizajnom i hemijskom sintezom poznatih molekula ili pretraživanjem kolekcija hemijskih molekula druge prirode. Analozi AHL se dizajniraju uvođenjem modifikacija na bočnom lancu, na laktonskom prstenu, ili istovremenom modifikacijom oba dela molekula.

Neki od primera potentnih analoga su derivati AHL sa atomom hlora na različitim pozicijama molekula koji pokazuju veću inhibitornu aktivnost od derivata sa fluorom na proces formiranja biofilmova multirezistentnog soja *P. aeruginosa* (Kalaiarasan *et al.*, 2017). Takođe, derivati AHL sa molekulom pirona su se pokazali kao dobri inhibitori Las signalnog puta kod *P. aeruginosa*, tako što se kompetitivno vezuju za receptor LasR (Park *et al.*, 2015). *N*-(2-oksocikloheksil)-3-oksododekanamid pokazuje antagonističko dejstvo na Las sistem, dok *N*-(2-hidroksifenil)-3-oksododekanamid inhibira Las i Rhl sistem kod *P. aeruginosa* (Smith *et al.*, 2003a, 2003b). Sintetički analog 3-oxo-C12-HSL inhibira aktivnost LasR sistema *P. aeruginosa* (C. Kim *et al.*, 2009). *N*-dekanoilciklopentilamid (C10-CPA), analog AHL, inhibira formiranje biofilmova i smanjuje virulentnost bakterija delovanjem na Las i Rhl sistem *P. aeruginosa* (Tateda *et al.*, 2003), dok C9 (*N*-nanoil)-CPA, takođe analog AHL-a, utiče na viruelnciju regulisanu međubakterijskom komunikacijom *S. marcescens* (Morohoshi *et al.*, 2007). Sintetički *N*-acil (S) homoserin laktoni utiču na međubakterijsku komunikaciju *P. aeruginosa* i to najviše na produkciju piocijanina čija je sinteza regulisana PQS signalnim putem (Welsh *et al.*, 2015).

1.4.3.2. Hinolini i njihovi derivati

Hinolini su jedinjenja opisana u literaturi kao jedinjenja sa širokim spektrom antimikrobnih aktivnosti uključujući antibakterijsko, antifungalno, antivirusno i antiparazitsko dejstvo (Chung *et al.*, 2015). Takođe, ova jedinjenja pokazuju i inhibitorno dejstvo protiv neurotoksina botulinuma, antiinflamatorno i antitumorsko dejstvo (Videnovic *et al.*, 2014), pa se već dugo koriste u lečenju različitih vrsta bolesti.

Sintetički antibiotici, derivati hinolina, koriste se u kliničkoj praksi kao terapeutici urinarnih i respiratornih infekcija. Neki od antibiotika hinolinske strukture (tačnije hinolonske strukture, tatutomernog oblika 4-hidroksihinolina) su nalidiksična kiselina, koji je u upotrebi još od 1964. godine, a ostali derivati hinolina/hinolona su ciprofloksacin, ofloksacin, levofloksacin, norfloksacin i drugi. Većina njih pripada fluorofloksacinima, antibioticima koji su se pokazali kao veoma potentni na velikom broju vrsta Gram-negativnih bakterija, a mehanizam njihovog dejstva je inhibicija DNK giraze i topoizomeraze IV.

U kliničkoj praksi za lečenje urinarnih infekcija koristi se i antibiotik hinolinske prirode, nitroksolin za koji je pokazano da inhibira formiranje biofilмова *P. aeruginosa* (Sobke *et al.*, 2012). Halogenizovana hinolinska jedinjenja uspešno remete formiranje biofilмова patogenih sojeva roda *Staphylococcus* i *Enterococcus faecium* koji je rezistentan na vankomicin, i to u niskim koncentracijama (Basak *et al.*, 2015). Biblioteke sintetičkih derivata hinolina koji sadrže amino i hidroksilne grupe na različitim pozicijama uspešno inhibiraju formiranje biofilмова Gram-negativnog patogena *Vibrio cholerae* (Leon *et al.*, 2015). Derivati 4-hidroksi hinolina sa hidrazonskim i pirazolnim grupama pokazuju antibakterijsku aktivnost na *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* i *Mycobacterium tuberculosis* (Eswaran *et al.*, 2010).

Pored anti-bakterijske aktivnosti hinolina, poznato je da mnoga jedinjenja ove klase mogu imati i antifungalno dejstvo (Musiol *et al.*, 2010). Nederivatizovan hinolin u netoksičnim koncentracijama ima relativno visoku inhibitornu aktivnost prema nekim vrstama gljiva. Derivatizacijom već aktivnog jedinjenja, čak i derivati jednostavne strukture kao što je derivat 8-hidroksi hinolin, dobijaju se jedinjenja znatno povećane antifungalne aktivnosti. Jedan od primera su i halogenhinolini koji su aktivni antifungalni agensi prema medicinski značajnim vrstama gljiva *C. albicans* i *Cryptococcus* sa intracelularni mehanizam delovanja.

Derivati hinolina se kao anti-virulentni agensi, odnosno inhibitori međubakterijske komunikacije razvijaju tek poslednjih dvadesetak godina. Vrste rodova *Pseudomonas*, *Burkholderia* i *Alteromonas* koriste jedinjenja hinolinske prirode kao signalne molekule u međubakterijskoj komunikaciji, pa se smatra da bi se derivatizacijom hinolina mogli dobiti anti-virulentni agensi koji bi specifično delovali samo na ove vrste.

Analozi molekula HHQ, autoinducera PQS sistema, do sada su sintetisani sa različitim varijantama bočnih alkil nizova, kao i substituentima na različitim pozicijama hinolinskog prstena u cilju dobijanja jedinjenja koja mogu da inhibiraju PQS signalni put. Derivati sa hidroksilnim grupama pokazali su antagonističku aktivnosti prema PqsR receptoru kod *P. aeruginosa* (Lu *et al.*, 2012). Kao izuzetno aktivni PQS inhibitori pokazali su se derivati koji sadrže supstituente na benzenovom prstenu i 3-alkil supstituente koji skoro potpuno inhibiraju PQS signalni put, kao i sintezu viruelntnih faktora regulisanih ovim signalnim putem (Lu, Kirsch, *et al.*, 2014).

Hinolin, kao i njegov izoestar hinazolin, su dokazani potentni kompetitivni inhibitori PqsR receptora PQS sistema (Ilangovan *et al.*, 2013). Hinolini supstituisani različitim atomima na poziciji C4, takođe su se izdvojili kao potentni inhibitori PqsR receptora (Soukariéh *et al.*, 2018).

Amidni derivati dugih lanaca C atoma, supstituisani 2-amino-4-hinoloni uspešno inhibiraju formiranje biofilmova *P. aeruginosa* i *S. marcescens*, pri čemu ne pokazuju baktericidno dejstvo (Espinosa-Valdes *et al.*, 2019). Najaktivniji derivati sadrže alkilne lance sa 12 ili više C-atoma, a generalno su pokazali veću aktivnost na *P. aeruginosa*.

Jednostavnim malim strukturnim promenama dobijaju se hinolini sa izraženom aktivnošću i širokim spektrom delovanja. Uz veliku aktivnosti, citotoksični efekti na ćelijama su niski. Iz tih razloga farmakofora hinolina predstavlja dobro polazno jedinjenje za dizajn i razvoj različitih vrsta terapeutika, pre svega potentne anti-virulentne agense.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Potruga za novim bioaktivnim jedinjenjima u cilju pronalaska novog anti-virulentnog agensa protiv multirezistentnih patogenih sojeva predstavlja prioritet na globalnom nivou. Jedinjenja sa nekim novim mehanizmom delovanja omogućila bi borbu protiv infekcija uspešnijom, pa kao i dodatak već postojećim terapijama. Sredinski mikroorganizmi predstavljaju nepresušan izvor biomolekula, jedinjenja raznovrsne hemijske strukture sa potencijalnom aktivnošću. Moderna tehnologija i savremene hemijske metode omogućile su naučnicima da dizajniraju i sintetišu najrazličitija jedinjenja, po ugledu na prirodne molekule sa novim spektrom aktivnosti.

Cilj ovog rada bio je pronalazak aktivnog/ih jedinjenja sa anti-virulentnim karakteristikama na patogenim sojevima dve Gram negativne bakterije *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens* ATCC 27117. Potraga za jedinjenjima prirodnog porekla podrazumevala je pretragu kolekcije sredinskih mikroorganizama Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Sintetički derivati pravljani su u saradnji sa istraživačima Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

Specifični ciljevi ovog rada su

- Potraga za malim molekulima prirodnog porekla sa anti-virulentnim dejstvom na patogene vrste *P. aeruginosa* i *S. marcescens* pretraživanjem kolekcije sredinskih mikroorganizama Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, gajenjem mikroorganizama u različitim hranljivim podlogama i ekstrakcijom sekundarnih metabolita organskim rastvaračem etil acetatom.
- Identifikacija aktivnog jedinjenja iz ukupnog bakterijskog ekstrakta, hemijskim metodama za frakcionisanje kompleksnih smeša jedinjenja i NMR analiza aktivne frakcije.

- Određivanje strukturnih zahteva neophodnih za uspostavljanje inhibicije virulentnosti *P. aeruginosa* i *S. marcescens* testiranjem bioloških aktivnosti biblioteke hemijski sintetisanih 4-aminohinolina, analoga prirodnih autoinducera PQS sistema međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa*.
- Ispitivanje aktivnosti jedinjenja serijom *in vitro* eseja, tj. utvrđivanje uticaja na značajne virulentne faktore oba patogena soja kao što su formiranje i rasturanje biofilmova, sinteza pigmenata, kretanje i produkcija elastaza.
- Ispitivanje uticaja derivata 4-aminohinolina na signalne puteve međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa* u esejima produkcije autoinducera signalnih puteva i kompeticije za odgovarajući receptor.
- Određivanje mehanizama delovanja i optimizacija anti-virulentih aktivnosti odabranih molekula daljom derivatizacijum.
- Utvrđivanje efekta strukturalnih promena testiranog molekula na bioaktivnost model organizama.
- Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja na *in vivo* model organizmima *Danio rerio* i *Caenorhabditis elegans*.
- Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti derivata 4-aminohinolina i modelovanje formiranja biofilmova *S. marcescens*.
- Predviđanje orijentacije vezivanja odabranih derivata 4-aminohinolina za receptor PQS signalnog puta (PqsR receptor).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi i njihova kultivacija

U ovom radu korišćeni su referentni sojevi *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NCTC 10332) iz Nacionalne kolekcije bakterijskih sojeva (NCTC, eng. National Collection of Type Cultures, Culture Collection of Public Health, Ujedinjeno Kraljevstvo) i *Serratia marcescens* (ATCC 27117) iz Američke kolekcije bakterijskih sojeva (ATCC, eng. American Type Culture Collection, SAD).

Ostali bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu su: *P. aeruginosa* PA14, *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997), *P. aeruginosa* PAO1 pBBR2-GFP (Passos da Silva *et al.*, 2014) i *P. aeruginosa* DM50 (u radu opisan kao BK25H) (Milivojevic *et al.*, 2018) i *Escherichia coli* OP50 dobijenog ljubaznošću prof. dr Aleksandre Trifunović, Cluster of Excellence for Aging Research, Keln, Nemačka. Takođe, korišćeni su i biosenzor sojevi za ispitivanje međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa* i to: *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-*rhlA* (Δ rhlA PrhlA::lux) (Duan i Surette, 2007), *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ lasl Prsal::lux) (Massai *et al.*, 2011), *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA (CTX lux::pqsA) (Fletcher *et al.*, 2007), Biosenzorski sojevi su dobijeni ljubaznošću dr Livie Leoni (Università Degli Studi Roma Tre, Rim, Italija).

Pored laboratorijskih bakterijskih sojeva u ovom radu su korišćeni i sredinski izolati iz laboratorijske kolekcije Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

3.1.1. Mikrobiološke podloge

U ovom radu korišćene su različite hranjive podloge sledećeg sastava:

LB (Luria Bertani bujon): NaCl 10 g/l, ekstrakt kvasca 5 g/l, tripton 10 g/l.

Polučvrsti LA: NaCl 10 g/l, ekstrakt kvasca 5 g/l, tripton g/l, agar 3g/l.

JS: glukoza 20 g/l, skrob 20 g/l, manitol 15 g/l, sojino brašno 30 g/l, CaCO₃ 10 g/l.

M8: Na₂HPO₄ 5 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, glukoze 0,2%, kazaminokiselina 0,5% i 1 mM MgSO₄.

M9: NH₄Cl 18,7 mM, KH₂PO₄ 21,7 mM, Na₂HPO₄ 47,7 mM, NaCl 8,6 mM, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 1 mM, glukoza 0,2 g/l, L-arginin 0,4 g/l, monohidrat limunske kiseline 0,2 g/l, kazamino kiseline 0,5 g/l, natrijum sukcinat hidratizirani 0,2 g/l i monohidratna so L-glutamične kiseline 0,2 g/l.

TSB (*eng.* Triptic Soy broth): tripton soja bujon 30 g/l.

HNC: ekstrakt kvasca 60 g/l, SDS 0,5 g/l, CaCl₂ 0,5 g/l.

Vegetativni medijum: tripton soja bujon 8 g/l, ekstrakt kvasca 4 g/l, maltoza 15 g/l, CaCO₃ 2 g/l.

ISP2 (International Streptomyces Project): ekstrakt kvasca 4 g/l, „malt“ ekstrakt 10 g/l, glukoza 4 g/l, agar 20 g/l. Komponente se rastvaraju u česmenskoj vodi.

MSF (Mannitol Soya Flour): manitol 20 g/l, sojino brašno 20 g/l. Komponente se rastvaraju u česmenskoj vodi.

Za pravljenje čvrstih podloga dodavan je agar 15g/l, odnosno 3g/l za pravljenje polučvrstih podloga. Sve komponente su rastvorene u destilovanoj vodi, osim ako nije drugačije navedeno (ISP2 i MSF). Sve podloge su sterilisane autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C, osim MSF podloge koja je sterilisana autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C, dva puta.

3.1.2. Izolacija bakterija iz rizosfere biljaka

Zemlja uzorkovana na različitim lokalitetima je transportovana u sterilnim plastičnim epruvetama i odmah je korišćena za izolaciju mikroorganizama. Za izolaciju su korišćene ISP2, HNC i MSF hranljive podloge (odjeljak 3.1.1). Grumen zemlje mase 0,5 g inkubiran je 30 minuta u HNC tečnoj podlozi u koju su dodavani nalidiksična kiselina (10 µg/ml), nistatin (50 µg/ml) i cikloheksimid (50 µg/ml), na 42 °C uz mešanje od 200 obrt/min na orbitalnoj mešalici.

Nakon inkubacije, po 100 µl 10⁻² razblaženja utrljavano je na čvrste ISP2 podloge u koje su dodati prethodno pomenuti antibiotici i antimikotici, u duplikatu, i ostavljene na 30 °C na daljoj inkubaciji. Sedam dana kasnije, morfološki različite kolonije su presejavane na MSF čvrste podloge, a potom su pripremljene za dugoročno čuvanje (Odeljak 3.1.3).

3.1.3. Dugoročno čuvanje bakterijskih sojeva

Bakterijski sojevi su čuvani u LB hranljivoj podlozi sa 20% glicerola (Merck, Nemačka) u zamrzivaču na -70 °C (ESCO, Lexicon ULT Freezer, Singapur), prethodno zamrzavani u tečnom azotu. Za potrebe eksperimenata izolati su oživljavani i gajeni na LA podlozi (odjeljak 3.1.1) na 37 °C tokom 24 sata.

Radi dugoročnog čuvanja laboratorijskih izolata streptomiceta i drugih sporogenih pravljene su suspenzije spora (Kieser *et al.*, 2000). Čiste kulture streptomiceta gajene na MSF čvrstim podlogama (odjeljak 3.1.1.) sedam dana inkubacije na 30 °C. Sporulišuća kultura prikupljena je ezom i resuspendovana u 10 ml sterilne dejonizovane vode, a potom filtrirana kroz tampon od sterilne vate. Spore su nakon toga centrifugirane 5 minuta pri brzini od 5000 obrt/min na 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5084R, Eppendorf, Nemačka) i resuspendovane u 20% (v/v) glicerolu i zatim čuvane u zamrzivaču na -70 °C (ESCO, Lexicon ULT Freezer, Singapur). Za potrebe eksperimenata izolati su oživljavani i gajeni na MSF čvrstoj podlozi na 30 °C tokom sedam dana.

3.1.4. Kultivacija bakterija

Sporulišuće bakterije

Iz suspenzije spora izolati su ezom zasejavani na MSF čvrste podloge i inkubirani sedam dana na 30 °C. Primarna kultura je pripremana u vegetativnom medijumu koji je inkubiran 48 h uz mešanje od 180 obrt/min na orbitalnoj mešalici. Tečna JS hranljiva podloga je inokulisana primarnom kulturom (odjeljak 3.1.1.) (1% v/v) u „tikvicama” po Erlenmajeru u koje je stavljana sterilna metalna žica radi bolje aeracije i inkubirana na 30 °C uz mešanje od 180 obrt/min na orbitalnoj mešalici tokom sedam dana.

Različiti sojevi Gram negativnih bakterija

Ovi sojevi gajeni su preko noći, 20 sati pod uslovima koji odgovaraju soju. Za sve vrste roda *Pseudomonas* prekonoćne kulture pripremane su u LB hranljivoj podlozi i gajene na 180 obrt/min na orbitalnoj mešalici na 37 °C.

Prekonoćne kulture vrste *S. marcescens* pripremane su u LB hranljivoj podlozi i gajene na 180 obrt/min na orbitalnoj mešalici na 30 °C, kao i biosensor soj *Chromobacterium violaceum* CV026.

3.2. Ekstrahovanje sekundarnih metabolita bakterija i njihova hemijska karakterizacija

3.2.1. Pripremanje ukupnih ekstrakata iz bakterijske kulture

U kulture streptomiceta/sporulišućih bakterija, gajene na način opisan u odeljku 3.1.4, dodavana je jednaka zapremina etil acetata (Sigma-Aldrich, Nemačka) sa 5% (v/v) NaCl. Takve kulture su inkubirane 18 sati na 30 °C uz mešanje od 180 obrt/min u orbitalnoj mešalici. Nakon inkubacije centrifugirane su pri brzini od 5000 obrt/min na 4 °C (Sorvall Centrifuge RC-5B, Thermo Fisher Scientific, SAD), da bi se etil acetatna faza odvojila. U etil acetatnu fazu dodavano je do 10% (v/v) anhidrovanog MgSO₄ i potom inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi. Etil acetatna faza je filtrirana kroz 1MM filter-papir (Munktell Filter, Švedska), pa uparavana pod vakuumom (Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik, Švajcarska). Masa osušenog ekstrakta je merena na analitičkoj vagi (Sartorius, Nemačka). Suvi ekstrakt je čuvan na -20 °C, do korišćenja.

3.2.2. Razdvajanje bakterijskih ekstrakata na frakcije i strukturna karakterizacija aktivnog jedinjenja

3.2.2.1. Tankoslojna hromatografija (TLC)

Tankoslojna hromatografija izvođena je na hromatografskim pločicama od 0,25 mm Kieselgel 60 F₂₅₄, (Merck, Nemačka). Svi rastvarači korišćeni u svrhu prečišćavanja ekstrakata, posebnog stepena čistoće, nabavljani su od kompanije Merck (Nemačka).

Ekstrakti su prvo analizirani TLC metodom da bi se odredio odgovarajući sistem eluenata. Sledeće smeše rastvarača su korišćene za razdvajanje frakcija: heksan–etil acetat u odnosu 1:1; čist etil acetat i etil acetat–metanol 8:2.

Staklenim pipetama zapremine do 5 µl nakapavana je mala zapremina ekstrakta na startnu liniju TLC pločice. U zatvorenu komoru sipani su rastvarači, a prethodno pripremljena pločica sa uzorcima pažljivo je spuštana u komoru da bi se izbeglo neravnomerno putovanje eluenata kroz pločicu.

Hromatogram je razvijan par minuta, nakon čega je pločica sušena i potapana u vodeni rastvor kalijum permanganata (5% K_2MnO_4 i 0,25% NaOH). Nakon par sekundi pločica je vađena, sušena i odmah slikana.

3.2.2.2. Prečišćavanje na koloni

Za razdvajanje ekstrakta u frakcije korišćena je gravitaciona kolona sa silika gelom (prečnik kolone 19 mm, 20 cm silika gela u koloni, veličina čestica 0,035 mm – 0,075 mm, 230-400 mesh). Radi stabilizacije kolone, preko silika gela je sipan heksan. Ekstrakt je rastvoren u dihlormetanu pre nanošenja na kolonu. Prilikom prvog razdvajanja korišćen je sledeći sistem rastvarača: heksan–etil acetat u odnosu 3:1, heksan–etil acetat 1:1, etil acetat–metanol 9:1 i čist metanol. Svi rastvarači su dodavani na kolonu u zapremini od 100 ml. Prikupljene frakcije su prvo analizirane tankoslojnom hromatografijom (odeljak 3.2.2.1), a zatim su odgovarajuće frakcije spojene, uparene pod vakuumom (Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik, Švajcarska) i izmerene. Aktivnost dobijenih frakcija je testirana u testu inhibicije formiranja biofilma (odeljak 3.4.2.), a aktivna frakcija je dalje razdvajana sledećim sistemom rastvarača: čist etil acetat, etil acetat–dihlormetan–metanol (8:1:1) i etil acetat–dihlormetan–metanol (4:2:1). Svi rastvarači su dodavani na kolonu u zapremini od 50 ml, nakon čega su frakcije uparene i izmerene.

3.2.2.3. Tečna hromatografija i masena spektrometrija

Prečišćene frakcije aktivnih suspstanci dalje su razdvajane tečnom hromatografijom i analizirane masenom spektroskopijom (LC-MS). Analiza je rađena na instrumentu za tečnu hromatografiju (HPLC Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, SAD) sa C18 kolonom Zorbax Eclipse XDB-C18 RRHT (50×4,6 mm, unutrašnjeg prečnika od 1,8 μm) i diodnim detektorom (*eng.* diode-array detector) povezanim sa 6210 Time-of-Flight LC-MS sistemom (AgilentTechnologies, SAD). Radna temperatura kolone bila je 40 °C sa konstantnom stopom protoka od 0,5 ml/min, a zapremina injektiranja je bila 10 μl . Kao eluenti korišćeni su 0,2% vodeni rastvor mravlje kiseline (A) i acetonitril (B) prema program predstavljenom u tabeli 2. Spektri su snimani u opsegu od 190-900 nm, a beleženi su u pozitivnom jonskom modu u opsegu odnosa masa/naelektrisanje (m/z) od 100 do 1500.

Tabela 2. Uslovi za semi preparativnu HPLC analizu

Vreme [min:s]	Mobilna faza	
	% A	% B
0-0:24	95	5
0:24-10	5	95
10-15	5	95
15-15:30	95	5
15:30-20	95	5

3.2.2.4. Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) i masena spektroskopija

NMR spektri snimljeni su na Bruker Ultrashield Advance III spektrometru (Bruker, SAD) i na 500 MHz i 125 MHz, u navedenim rastvaračima uz tetrametilsilan kao interni standard. Hemijska pomeranja (δ) izražena su u ppm (*eng.*, parts per milion) ppm, dok su konstante kuplovanja (J) izražene u Hz. Za obeležavanje detektovanih signala, asignacije korišćene su sledeće skraćenice: singlet (*s*), dublet (*d*), triplet (*t*), kvartet (*q*), dublet-dubleta (*dd*), multiplet (*m*).

Maseni spektri ESI-MS (*eng.* ElectroSpray Ionization-Mass Spectroscopy) snimani su na LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, SAD) instrumentu u pri pozitivnoj jonizaciji direktnim injektiranjem uzorka. Uzorci su rastvarani u MeOH, HPLC čistoće. Odabrani parametri su: kapilarni napon 49 V, kapilarna temperatura 275 °C, temperatura isparavanja 60 °C, Elektrosprej efekat je postizan primenom napona od 4,2 kV, rezolucija pri m/z 400 iznosila je 30 000. Uzorci su analizirani na instrumentu 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Thermo Fisher Scientific, SAD) pri pozitivnoj jonizaciji.

3.3. Sinteza i derivatizacija jedinjenja

3.3.1. Derivatizacija jedinjenja di-ramnolipida

Sve komponente korišćene prilikom derivatizacije nabavljene su od kompanije Merck (Nemačka). Di-ramnolipidi su rastvoreni u rastvoru dihlormetana i dimetilformamida (odnos 2,7:0,3 ml).

Tom rastvoru dodati su 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (0,12 mmol), 4-dimetilaminopiridin (DMAP) (0,05 mmol) i amini (benzil amin, piperidin i morfolin; 0,3 mmol). Smeša je mešana 16 sati na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije smeša je razblažena vodom (10 ml) i ekstrahovana dihlormetanom (3×15 ml). Ekstrakt je sušen sa MgSO₄, filtriran i uparen pod vakuumom (Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik, Švajcarska). Suva masa je prečišćena hromatografskim metodama sa sistemom rastvarača etil acetat–metanol–dihlormetan u odnosu 4:2:1. Ovako pripremljeni di-ramnolipidi rastvoreni su u 3 ml dimetilformamida (DMF) pa je potom dodat tert-butidimetilsilil hlorid TBDMS-Cl (1,6 mmol), AgNO₃ (1,6 mmol) i piridin (3,2 mmol). Ova smeša je inkubirana preko noći na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Nakon inkubacije u smešu je dodato 10 ml vode, pa je potom izvršena ekstrakcija etil acetatom (3×20 ml). Suva masa je prečišćena hromatografskim metodama sa sistemom rastvarača petrol etar - etil acetat (7:1).

Fizičko-hemijske karakteristike svih dobijenih derivata analizirane su programom za hemijske predikcije Marvin Sketch 17.2.13.0 (ChemAxon). Na isti način su derivatizovani i komercijalno nabavljeni ramnolipidi (Agae technology, SAD).

3.3.2. Sinteza aminohinolina i njihova derivatizacija

Za potrebe ovog istraživanja derivate aminohinolina sintetisao je dr Dejan Oспенica iz Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu. Ukupno 27 jedinjenja u biblioteci derivata 4-aminohinolina (uključujući i kontrolna jedinjenja, odnosno grupe kojima su jedinjenja derivatizovana) i ukupno 8 jedinjenja *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina.

3.4. Testiranje anti-virulentnih aktivnosti prečišćenih sekundarnih metabolita i hemijski sintetisanih jedinjenja i njihovih derivata

3.4.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Minimalna inhibitorna koncentracija određivana je standardnom mikrodilucionom metodom u LB hranljivoj podlozi (odjeljak 3.1.1.) po protokolu Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*eng.* Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (Cockerill *et al.*, 2012).

Eksperiment je rađen u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna (Kartell, Italija). Jedinjenja za koje se određivane MIK vrednosti testirana su u opsegu koncentracija od 500 µg/ml do 3,91 µg/ml, odnosno od 4 mM do 0,05 mM, a koje su dobijene dvotrukim serijskim razblaženjima. Prekonoćen kulture *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens*, pripremane su na opisan način (odjeljak 3.1.4.), a razblaživane su tako da se u svakom bunarčiću nalazilo 10^5 CFU/ml (*eng.* CFU-colony-forming unit). Za rastvaranje svih jedinjenja korišćen je dimetil sulfoksid (DMSO). Deo svakog eksperimenta je bila kontrola sterilnosti podloge koja je korišćena za postavku eksperimenta, odnosno kontrola sterilnosti rada i kontrola rasta soja (maksimalna koncentracija DMSO u kontroli 1%). Nakon inokulacije ($t=0$) kao i nakon inkubacije od 24 sati merena je na optička gustina (*eng.* Optical Density, OD) na aparatu Tecan Infinite 200 Pro Multiplate Reader (Tecan, Švajcarska). Minimalna inhibitorna koncentracija je utvrđivana kao najniža koncentracija testiranog jedinjenja koja inhibira vidljivi rast nakon 20 sati tretmana.

3.4.2. Uticaj jedinjenja na formiranje biofilмова kod *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens*

Metoda je preuzeta iz rada Merritt i saradnika (Merritt *et al.*, 2005), uz modifikacije. Testiranje jedinjenja na proces formiranja biofilмова izabranih bakterijskih sojeva rađeno je u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića i ravnim dnom (Kartel, Italija). Sva jedinjenja rastvarana su u DMSO i čuvana na 4°C.

Prekonoćne kulture (odjeljak 3.1.4.) su razblaživane do optičke gustine (*eng.* Optical Density, OD) OD_{600} 0,05 (broj ćelija $4,5-5 \times 10^7$ CFU/ml. U bunarčiće je sipano po 100 µl ovako razblažene kulture u prisustvu subinhibitornih koncentracija jedinjenja. Svaka koncentracija jedinjenja testirana je u minimum šest ponovaka, zajedno sa kontrolama, sterilnosti i kontrole formiranja biofilma (DMSO 0,1%). Tako pripremljene ploče inkubirane su u uslovima odgovarajućim za bakterijski soj. Nakon inkubacije planktonske (slobodnoživuće) ćelije uklonjene su iz bunarčića, a ploča je ispirana dva puta uranjanjem u posude sa destilovanom vodom i potom osušena. Ukupna biomasa biofilma obojena je dodavanjem 150 µl kristal violeta (0,1 %, v/v, Serva, Nemačka), nakon čega je ploča inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi. Ploča je na isti način isprana i osušena, a zatim je boja rastvorena dodavanjem 150 µl sirćetne kiseline (33%, v/v, Serva, Nemačka).

Kvantifikacija biofilma je određivana merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 590 nm na aparatu Tecan Infinite 200 Pro Multiplate Reader (Tecan Group Ltd., Švajcarska). Inhibicija biofilma je izražavana kao razlika u procentu formiranog biofilma u odnosu na netretiran biofilm testiranih sojeva.

3.4.2.1. Uticaj jedinjenja na formiranje biofilмова kod *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens* nakon faze adhezije

Prekonočne kulture (odjeljak 3.1.4.) su razblaživane do optičke gustine OD₆₀₀ 0,2 (broj ćelija $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml. U bunarčiče je sipano po 100 µl ovako razblažene kulture, pa su potom ćelije inkubirane tri sata pod uslovima koji odgovaraju testiranom bakterijskom soju da bi ćelije adherirale za dno bunarčiča. Nakon toga (faze adhezije) bunarčiči se ispiraju dva puta sterilnim PBS ((eng. Phosphate Buffered Saline – PBS): NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄×2 H₂O 1,78 g/l, KH₂PO₄ 0,27 g/l; pH 7,4.) puferom pa se po po 100 µl sveže hranljive podloge sa jedinjenjima koja se testiraju, u odgovarajućim koncentracijama, sipa se u bunarčiče, nakon čega sledi inkubacija od još 18 sati pod uslovima koji odgovaraju bakteriji na kojoj se testira aktivnost jedinjenja. Procedura bojenja i evaluacije rezultata opisana je u odeljku 3.4.2.

3.4.2.2. Ispitivanje anti-adhezivnog potencijala jedinjenja

Metoda za ispitivanje anti-adhezivnih svojstava testiranih jedinjenja na proces formiranja biofilмова rađena je po opisanoj metodologiji (Shetye *et al.*, 2014) uz neke modifikacije. Prekonočna kultura *P. aeruginosa* PAO1 pBBR2-GFP (odjeljak 3.4.1.) razblažena je do optičke gustine OD₆₀₀ 0,02 u tečnoj hranljivoj podlozi (M9+LB 95:5, odeljak 4.1.1.) uz prisustvo antibiotika (gentamicin 30 mg/ml, tetraciklin 20 mg/ml i hloramfenikol 50 mg/ml). Nakon što je kultura dostigla optičku gustinu OD₆₀₀ od 0,1, u svaki bunarčić mikrotitracione ploče je stavljeno po 200 µl bakterijske kulture koje su potom inkubirane na 37 °C da bi proces formiranja biofilмова započeo tokom 2 h. Nakon inkubacije sadržaj bunarčiča je ispražnjen, a sveža hranljiva podloga dodata (podloga M9-LB 95:5, odeljak 3.1.1.). Fluorescencija je merena na 500nm (ekscitacija 540nm) na aparatu Tecan Infinite 200 Pro Multiplate Reader (Tecan Group Ltd., Švajcarska).

Intenzitet fluorescencije odgovarao je količini adheriranih ćelija nakon dva sata inkubacije u prisustvu testiranih jedinjenja, u odnosu na kontrolu (DMSO koliko %).

3.4.2.3. Ispitivanje uticaja jedinjenja na fluorescenciju GFP

Pet mililitara prekonoće bakterijske kulture *P. aeruginosa* PAO1 pBBR2-GFP (odjeljak 3.4.1.) isprano je dva puta u sterilnom PBS puferu i ukoncentrovana u istom puferu pre sonifikacije. Sonifikovanje je rađeno u četiri ciklusa u trajanju od 15 sekundi sa pauzama u istom trajanju između ciklusa (MSE Soniprep 150, London, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Uzorak je centrifugiran 10 minuta na 13000 obrt/min na 4 °C (Eppendorf 5145 D centrifuge, Eppendorf, Nemačka), a dobijen ekstrakt koji ne sadrži ostatke ćelija je inkubiran sa jedinjenjima. Kao kontrola korišćen je 1% DMSO, a uzorci su inkubirani 2 sata na 37 °C. Po završenoj inkubaciji uzorci su prebačeni (100 µl) u zatamnjene mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića ravnog prozirnog dna u kojima se onemogućava preklapanje signala koji potiču iz susjednih bunarčića (Microtiter plate black chimney well, Greiner, Austrija). Fluorescencija je merena na 500nm (ekscitacija 540nm) na aparatu Tecan Infinite 200 pro Multiplate Reader (Tecan, Švajcarska). Fluorescenca ćelija je izražena kao fluorescenca zavisna od gustine bakterijske kulture

3.4.2.4. Uticaj jedinjenja na disperziju već formiranog biofilma

Postavka eksperimenta opisana je u odeljku 3.4.2. Biofilmovi su formirani tokom 24 h u uslovima koji odgovaraju korišćenom bakterijskom soju. Nakon inkubacije planktonske ćelije su uklonjene, a je ploča isprana dva puta sterilnim PBS puferom. Ploča je potom osušena i u bunarčiće je dodavano po 100 µl LB hranljive podloge koja je sadržala jedinjenja čiji se uticaj analizira u subinhibitornim koncentracijama. Nakon inkubiranja od 20 sati u uslovima koji odgovaraju bakterijskom soju preostali biofilm je bojen i rezultati evaluirani prema proceduri opisanoj u odeljku 3.4.2.

3.4.3. Ispitivanje uticaja jedinjenja na različite vrste pokretljivost *P. aeruginosa* PAO1

Uticaj jedinjenja na pokretljivost *P. aeruginosa* PAO1 plivanjem i rojenjem, odnosno grčenjem analiziran je prema ranije opisnim protokolima (Ha *et al.*, 2014; Turnbull i Whitchurch, 2014). Hranljive podloge korišćene u ovim eksperimentima sadržale su različite koncentracije agara u zavisnosti od tipa kretanja na kom se testira aktivnost jedinjenja.

Posmatrana je migracija kolonije kroz podlogu, a pokretljivost je brojčano izražena prema formuli $r^2\pi$ (cm²), gde r predstavlja poluprečnik kružnice koju opisuju bakterije prilikom kretanja kroz agar. Prekonoćne kulture za potrebe ovih eksperimenata su razblaživane do gustine $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml.

3.4.3.1. Uticaj jedinjenja na plivanje *P. aeruginosa* PAO1

Kultura *P. aeruginosa* PAO1 gajena 20 sati na opisan način (odjeljak 3.1.) je razblaživana do gustine $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml. Polučvrste M8 hranljive podloge sa 0,3% (v/v) agara su inokulisane ubadanjem vrha sterilne čačkalice tako da vrh čačkalice probije hranljivu podlogu, ali da ne dotakne dno Petrijeve šolje. Inokulisane podloge inkubirane su na 37 °C tokom 20 sati.

3.4.3.2. Uticaj jedinjenja na rojenje *P. aeruginosa* PAO1

Za testiranje uticaja jedinjenja na pokretljivost tipa rojenja, korišćena je polučvrsta M8 podloga u koju je dodato 0.6% (v/v) agara, a bakterijska kultura je gajena i razblažena. Na sredinu podloge razlivene u Petrijevoj šolji nakapano je po 2,5 μ l razblažene kulture, pazeći da se podloga ne probije nastavkom prilikom nanošenja. Inokulisane podloge inkubirane su na 37 °C tokom 20 sati.

3.4.3.3. Uticaj jedinjenja na grčenje *P. aeruginosa* PAO1

Za testiranje uticaja jedinjenja na grčenje, korišćena je LA čvrsta podloga (odjeljak 3.1.1.) u koju je dodato 1% (v/v) agara, a bakterijska kultura je gajena i razblažena na način opisan u odeljku 3.4.3.1.

Sterilnim čačalicama je bakterijska kultura zasejana na hranljivu podlogu, tako da vrh čačalice probije hranljivu podlogu i dotakne dno Petrijeve šolje. Inokulisane podloge inkubirane su na 25 °C tokom 72 sata. Nakon isteka inkubacije agar je uklanjao metalnom špatulom i Petrijeva šolja osušena na sobnoj temperaturi. Potom je dno preliveno 2% (v/v) kristal violetom uz inkubaciju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Petrijeva šolja je nakon toga isprana destilovanom vodom i osušena.

3.4.4. Ispitivanje uticaja jedinjenja na međubakterijsku komunikaciju sojeva *C. violaceum* CV026 i *S. marcescens* u testu sa diskovima

Prekonoćne kulture *C. violaceum* CV026 i *S. marcescens* (odjeljak 3.1.4.) su razblažene 100 puta u polučvrstoj LA podlozi (odjeljak 3.1.1) i razlivane u Petrijeve šolje. Za pripremanje Petrijevih šolja za disk test, u bakterijsku kulturu *C. violaceum* CV026 (McClean *et al.*, 1997), dodavan je i N-heksanoil-L-homoserin lakton (HHL), inducer proizvodnje ljubičastog pigmenta violaceina, u finalnoj koncentraciji 5 µM. Po stezanju polučvrstog agara stavljeni su sterilni diskovi na površinu podloge, i na njih nanošena jedinjenja u koncentraciji od 250 µg/disku. Inhibitorno dejstvo testiranih jedinjenja detektovano je kao zona odsustva sinteze pigmenta oko diska.

3.4.5. Uticaj jedinjenja na produkciju piocijanina kod *P. aeruginosa* PA14

Produkcija proizvodnje piocijanina određivana je merenjem apsorbance supernatanta bakterijske kulture (O'Loughlin *et al.*, 2013) koje su gajene u prisustvu jedinjenja. Prekonoćna kultura *P. aeruginosa* PA14 (odjeljak 3.4.1.) razblažena je 1000 x u LB hranljivoj podlozi. Jedinjenja su dodavana u koncentraciji od 50 µg/ml u tako razblaženu bakterijsku kulturu. U eksperiment su uključene kontrola sterilnosti rada i negativna kontrola DMSO 1%. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su 24 sata na 37 °C uz 180 obrt/min na orbitalnoj mešalici. Nakon inkubacije 1 ml kulture je centrifugiran 20 minuta, 13000 obrt/min, 4 °C; u centrifugi Eppendorf 5145 D centrifuge (Eppendorf, Nemačka).

Izmerena je optička gustina OD₆₀₀ nm uroraka i apsorbance OD₆₉₅ nm (Ultraspec 3300 pro, Amersham Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo). Rezultati su izraženi po sledećoj formuli:

$$\text{PIOCIJANIN} = \text{OD}_{695} / \text{OD}_{600}$$

Rezultati su predstavljeni kao odnos proizvedenog piocijanina za svaki uzorak tretiran jedinjenjem u odnosu na piocijanin koji proizvodi referentni soj *P. aeruginosa* PA14 u prisustvu 1% DMSO izraženi u procentima.

3.4.6. Uticaj jedinjenja na produkciju elastaze

Ispitivanje uticaja jedinjenja na elastaznu aktivnost rađeno je po već opisanom protokolu (Ohman *et al.*, 1980). Prekonoćna kultura *P. aeruginosa* PAO1 (odeljak 3.1.4.) je razblažena 1000 puta u LB hranljivoj podlozi u prisustvu subinhibitornih koncentracija ispitivanih jedinjenja. Nakon inkubacije od 20 sati na 37 °C uz 180 obrt/min na orbitalnoj mešalici, kulture su centrifugirane 15 minuta, 13000 obrt/min, 4 °C; u centrifugi Eppendorf 5145 D centrifuge (Eppendorf, Nemačka). Po 900 µl pufera koji sadrži Kongo crvene boje (Sigma-Aldrich, Nemačka) 0,5 mg/ml, CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7,2 mešano je sa po 100 µl supernatanta. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su 20 sati na 37 °C uz mešanje od 70 obrt/min na orbitalnoj mešalici. Po završetku inkubacije uzorci su ponovo centrifugirani pod istim uslovima (da bi se uklonile čestice nerastvorene boje) pa je izmerena apsorbance OD₄₈₅ (Ultraspec 3300 pro, Amersham Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Rezultati su predstavljeni kao odnos intenziteta boje uzoraka tretiranog odgovarajućim jedinjenjem u odnosu na kontrolni uzorak sa 1% DMSO.

3.5. Vizualizacija biofilmova mikroskopijom

Formiranje biofilmova u prisustvu jedinjenja čija se anti-biofilm aktivnost evaluira, vizualizovano je skenirajućom elektronskom i fluorescentnom mikroskopijom. Skenirajućom elektronskom i fluorescentnom mikroskopijom analizirani su efekti jedinjenja na proces formiranja biofilmova.

Za vizuelizaciju fluorescentnom mikroskopijom korišćene su SYTO® 9 i PI (propidijum jodid) boje koje su deo standardnog komercijalnog paketa za bojenje LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD). Ove boje se vezuju za molekule DNK, pri čemu se PI koristi kao indikator vijabilnosti ćelija jer ne može proći kroz nenarušenu ćelijsku membranu, dok SYTO® 9 može.

3.5.1. Fluorescentna mikroskopija

Detekcija anti-biofilm potencijala jedinjenja na proces formiranja biofilmova P. aeruginosa PAO1 i S. marcescens

Prekonoćne bakterijske kulture (odjeljak 3.1.4.) razblaživane su do optičke gustine OD₆₀₀ 0,05 broj ćelija $4,5-5 \times 10^7$ CFU/ml i sipane u bunare mikrotitracionih pločama sa 6 bunara (Sarstedt, Nemačka) u zapremini od 2 ml u prisustvu jedinjenja u koncentracijama koje inhibiraju formiranje biofilmova za 50% (BFIC₅₀) kao i negativne kontrole DMSO 1%. U bunare stavljane su sterilne pokrovne pločice. Tako postavljene ploče inkubirane su 24 sata u statičnom položaju u uslovima koji odgovaraju bakterijskoj kulturi. Nakon inkubacije pokrovne pločice su vađene iz bunara, dva puta isprane uranjanjem u sterilni PBS pufer pa je na njih nakapano 350 µl rastvora PBS pufera koji je sadržao SYTO® 9 i PI u finalnoj koncentraciji od 2,5 µM. Pločice su inkubirane na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta, a po isteku inkubacije višak boje je otklonjen, pokrovne pločice oprane sterilnim PBS puferom, fiksirane metanolim i stavljene na mikroskopska stakla. Tako obojene ćelije posmatrane su na fluorescentnom mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, Japan), pod uveličanjem od 100x i 4000x. Obe korišćene boje detektovane su odgovarajućim filterima – SYTO® 9 maksimum ekscitacije/emisije 480/500 nm, a PI 490/635 nm. Mikrografije su analizirane u programu Cytovision 3.1 (Applied Imaging Corporation, SAD).

U sklopu ispitivanja anti-biofilm potencijala jedinjenja fluorescentnom mikroskopijom pored ispitivanja efekta jedinjenja na formiranje biofilmova ispitivan je i uticaj jedinjenja na rasturanje pre-formiranih biofilmova *P. aeruginosa* PAO1. Razblažena prekonoćna kultura sipana je u bunare mikrotitracionih pločama sa 6 bunara zapremini od 3 ml i u njih je stavljana po jedna sterilna pokrovna pločica. Ovako pripremljeni uzorci inkubirani su 24 sata u statičnom položaju u uslovima koji odgovaraju bakterijskoj kulturi.

Nakon inkubacije pločice su vađene, ispirane 2 puta sterilnim PBS puferom i prebačene u sterilnu mikrotitracionu ploču. U bunare je dodavan sterilana LB hranljiva podloga sa jedinjenjima u koncentracijama pri kojoj se formirani biofilm rasturi 50% (BDIC₅₀) kao i negativnom kontrolom DMSO 1% i inkubirano 24 sata statičnom položaju u uslovima koji odgovaraju bakterijskoj kulturi. Nakon inkubacije ploče su tretirne, obojene i snimane po istom principu.

3.5.2. Elektronska mikroskopija

Posmatranje biofilмова P. aeruginosa PAO1 i S. marcescens skenirajućom elektronskom mikroskopijom na medicinskim kateterima

Biofilmovi na medicinskim silikonskim kateterima (Romed, Holandija) su posmatrani skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Kateteri su sečeni ne jednake delove, 1 cm u dužini, i potom isečeni uzdužno da bi se biofilm formirao na unutrašnjem delu katetera. Prekonoćne bakterijske kulture (odeljak 3.1.4.) su razblažene do optičke gustine OD₆₀₀ 0,05 broj ćelija $4,5-5 \times 10^7$ CFU/ml. Po 2 ml ovako razblažene bakterijske kulture sipano je u bunare mikrotitracione ploče sa 6 bunara (Sarstedt, Nemačka) u prisustvu jedinjenja u koncentracijama koje inhibiraju formiranje biofilмова za 50% (BFIC₅₀) kao i negativne kontrole DMSO 1% i u svaki bunar je dodavan po jedan komad silikonskog medicinskog katetera. Tako postavljene ploče inkubirane su 24 sata u statičnom položaju u uslovima koji odgovaraju bakterijskoj kulturi. Nakon inkubacije, kateteri su vađeni iz mikrotitracione ploče, oprani dva puta u sterilnom PBS puferu i fiksirani metanolom.

Kateteri su pripremljeni za mikroskopiranje tako što su zalepljeni na ugljeničnu pločicu, a potom su prekriveni legurom zlata koristeći instrument Leica EM SCD005 (Leica Microsystems, Nemačka). Ovaj proces je urađen u vakuumu (pod pritiskom <0.05 mbar), sa strujom od 40 mA i na radnoj distanci od 50 mm, u trajanju od 100 sekundi. Tako pripremljeni uzorci posmatrani su pod SEM mikroskopom JEOL JSM-6610LV (JEOL, SAD).

3.6. Ispitivanje uticaja jedinjenja na signalne puteve međubakterijske komunikacije

Za ispitivanje uticaja jedinjenja na signalni put međubakterijske komunikacije vrste *P. aeruginosa* korišćeni su biosenzorski sojevi, mutanti kojima je sinteza autoinducera blokirana. To su *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-*rhlA* za merenje C4-HSL, *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ *lasI PrsA::lux*) za merenje 3-oxo-C12 HSL i *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA (CTX *lux::pqsA*) za kvantifikaciju PQS/HHQ.

3.6.1. Kvantifikacija produkovanih autoinducera signalnih puteva

Kvantifikacija produkovanih autoinducera signalnih puteva međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa* urađena je po prethodno opisanoj metodi (Pekmezovic *et al.*, 2016). Prekonoćna kultura *P. aeruginosa* PAO1 (odeljak 3.1.4) razblažena je u LB hranljivoj podlozi do optičke gustine OD₆₀₀ 0,05 broj ćelija $4,5-5 \times 10^7$ CFU/ml. U 5 ml razblažene bakterijske kulture dodavana su jedinjenja čiji su anti-virulentni potencijali ispituje i inkubirane su na 37 °C uz 180 obrt/min na orbitalnoj mešalici u trajanju od 6 sati. Nakon završene inkubacije, po 1 ml kultura centrifugiran je pod sledećim uslovima: 15 minuta 13000 obrt/min, 4 °C u centrifugi Eppendorf 5145 D centrifuge (Eppendorf, Nemačka), a je supernatant je propušten kroz 0,22 µm filter (Sarstedt, Nemačka). Tako pripremljen filtrat čuvan je na -20 °C do postavke eksperimenta.

Za kvantifikaciju produkcije 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolona (HHQ), autoinducera PQS sistema međubakterijske komunikacije razblažena prekonoćna kultura *P. aeruginosa* PAO1 gajena je 24 sata u prisustvu jedinjenja od interesa, a nakon toga su ekstrahovani autoinduceri PQS/HHQ. Kulture su prebaćne u plastične epruvete gde im je dodavana ista zapremina etil acetata zakišljenog 0,1% sirćetnom kiselinom (Sigma-Aldrich, Nemačka). Epruvete su mešane na orbitalnoj mešalici u trajanju od 30 minuta na 180 obrt/min. Potom je sadržaj centrifugiran na 5000 obrt/min u trajanju od 15 minuta i na 4 °C (Eppendorf 5804 R centrifuga). Organska faza, koja se izdvojila nakon centrifugiranja, je prebacivana u staklene balone i potom uparavna na vakuum uparivaču (Buchi rotavapor R-200, Buchi, Švajcarska). Suva masa je rastvorena u 50 µl čistog metanola (Sigma-Aldrich, Nemačka) i čuvana na 4 °C do postavke eksperimenta.

Prekonoćna kultura biosenzor sojeva (odjeljak 3.1.4.) pa je kultura razblaživana u LB hranljivoj podlozi do optičke gustine OD_{600} 0,045, što odgovara broju bakterija od $4,5-5 \times 10^7$ CFU/ml. U zatamnjenim mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog providnog dna (Greiner, Austrija) sipano je po 180 μ l razblaženih kultura biosenzora (*P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-rhlA (Δ rhlA PrhlA::lux) i *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ lasI Prsal::lux)) i po 20 μ l pripremljenog filtrata, ili po 200 μ l razblažene kulture *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA (CTX lux::pqsA) i po 5 μ l metanolnog rastvora autoinducera PQS sistema.

Prilikom postavke eksperimenta uključen je i DMSO kao kontrola. Mikrotitracione ploče su potom inkubirane na 37 °C u trajanju od 4 sata na orbitalnoj mešalici na 70 obrt/min. Nakon inkubacije merena je optička gustina (OD_{600}) i bioluminiscencija (Tecan Infinite 200 pro Multiplate Reader). Uticaj jedinjenja na signalne puteve međubakterijske komunikacije je računat prema sledećoj formuli:

$$\text{INHIBICIJA} = \text{luminiscencija}/OD_{600}$$

Uticaj jedinjenja na signalne puteve izražavan je u odnosu na kontrolu, razblažene kulture senzora sa LB hranljivom podlogom umesto filtrata, odnosno metanolom umesto metanolnog rastvora ekstrahovanih autoinducera.

3.6.2. Kompetitivna inhibicija receptora međubakterijske komunikacije

Prekonoćne kulture biosenzorskih sojeva (odjeljak 3.1.4) razblažene su u LB hranljivoj podlozi do optičke gustine OD_{600} 0,045 broj ćelija $4,5-5 \times 10^7$ CFU/ml. U razblažene kulture biosenzorskih sojeva dodavani su nativni autoinduceri u finalnoj koncentraciji 5 μ M. Za postavku eseja korišćene su zatamnjene mikrotitracione ploče (Greiner, Austrija), u bunarčiće su sipane ovako razblažene kulture biosenzorskih sojeva sa njihovim nativnim autoinducerima, a jedinjenja čiji se uticaj na međubakterijsku komunikaciju ispitivao dodavana su u subinhibitornim koncentracijama, kao i kontrola 1% DMSO. Finalna zapremina po bunaru bila je 200 μ l za sva tri biosenzorska soja. Tako postavljena ploča je inkubirana i merena na opisan način (Odeljak 3.6.1).

3.7. Određivanje toksičnosti jedinjenja

3.7.1. Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja na ćelijama MRC5 ćelijske linije

Citotoksičnost jedinjenja na MRC5 ćelijskoj liniji određivana je standardnom kolorimetrijskom metodom MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid), po opisanoj metodi (Hansen *et al.*, 1989). Metabolički aktivne ćelije se izdvajaju na osnovu svoje redukcionne sposobnosti, što se vizualizuje prelaskom MTT iz žute boje u ljubičastu koju daje formazan.

MRC5 ćelije se čuvane u krioprotektivnoj podlozi u tečnom azotu do potreba eksperimenata, a oživljavane se u RPMI-1640 podlozi (Sigma-Aldrich, Nemačka) sa dodatkom 100 µg/ml streptomicina (Sigma-Aldrich, Nemačka), 100 U/ml penicilina (Sigma-Aldrich, Nemačka) i 10% (v/v) goveđeg fetalnog seruma (Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, Nemačka). Ovako pripremljena suspenzija ćelija stavljana je u plastične posude za gajenje ćelijskih kultura (Sarstedt, Nemačka) u inkubatoru sa 5% CO₂ i na temperaturi od 37 °C do tri dana kada se formira konfluentan sloj ćelija. Nakon isteka inkubacije formirani ćelijski sloj je prvo ispiran sterilnim PBS puferom (prethodno zagrejan na 37 °C), a onda su ćelije odvajane od podloge tretmanom sa 1% tripsin-EDTA rastvorom (Sigma-Aldrich, Nemačka) uz inkubaciju na 37°C, u trajanju od 2 do 3 minuta. Tako pripremljene ćelije su mešane sa RPMI podlogom i prebačene u nove plastične posude, do postavke eksperimenta. U mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića ravnog dna (Kartell, Italija) dodavano je 10⁵ ćelija po bunarčiću zajedno sa jedinjenja u subinhibitornim koncentracijama, dok je 1% DMSO korišćen kao kontrola. Ploča je inkubirana 48 sati pa je potom dodavan MTT u finalnoj koncentraciji od 0,5 mg/ml u RPMI podlozi. Ćelije su inkubirane na 37° C u prisustvu 5% CO₂ u trajanju od 30 minuta. Nakon inkubacije podloga je uklonjena i dodat je DMSO (50 µl, 100% DMSO), da bi se rastvorili kristali formiranog formazana. Na aparatu Tecan Infinite 200 pro Multiplate Reader (Tecan, Švajcarska) merena je apsorbancija na talasnoj dužini 540 nm. Uticaj jedinjenja je izražavan u odnosu na kontrolu (1% DMSO). Inhibicija rasta ćelija za 50% predstavljala je IC₅₀ vrednost.

3.7.2. Ispitivanje toksičnosti jedinjenja na model sistemu *Caenorhabditis elegans*

Nematoda *C. elegans* AU 39 nabavljen je iz Centra za genetiku *C. elegans*, Univerziteta u Minesoti, SAD i gajena po opisanoj metodi (Stiernagle, 2006). Tokom sedam dana prećeno je preživljavanje nematoda u prisustvu jedinjenja čija se toksičnost ispitivala, a eksperimenti su rađeni po opisanim protokolima (Brackman *et al.*, 2011; Scoffone *et al.*, 2016). Podloge korišćene pri postavci eksperimenta: M9 rastvor (KH_2PO_4 3 g/l, Na_2HPO_4 6 g/l, NaCl 5 g/l, a posle autoklaviranja na 121 °C 15 minuta dodavan je 1 M MgSO_4 1 ml/l) i M9 obogaćena podloga (M9 bujona 95%, TSB bujona 5% i dodatak holesterola rastvorenog u 99% etanolu 10 µl/ml).

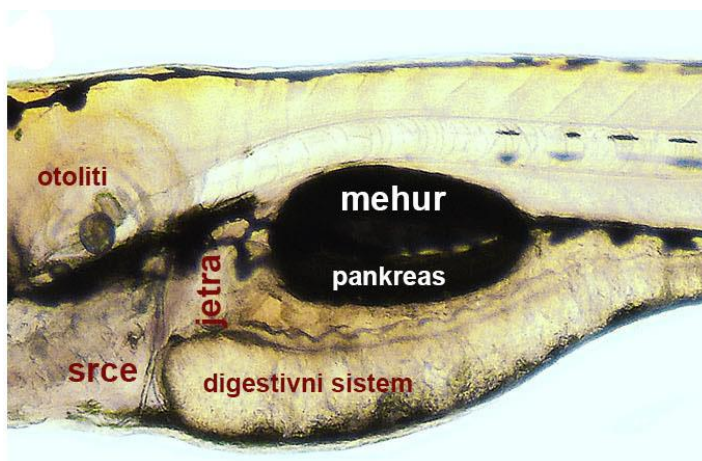
Nematode su gajene na specijalnoj podlozi NGM (*eng.* Nematode Growth Medium) koja je sadržala peptona 2,5 g/l, NaCl 3 g/l, agara 17 g/l i 970 ml destilovane vode, autoklavirano 15 minuta na 121 °C. Nakon sterilizacije u podlogu je dodavano holesterola 5 mg/ml (Sigma, Nemačka) rastvorenog u 99% etanolu, 1 M CaCl_2 1 ml, 1 M MgSO_4 1 ml, 1 M KPI pufera (108,3 g KH_2PO_4 ; 35,6 g K_2HPO_4 ; pH 6)) 25 ml. Podloga je izlivena u Petrijeve šolje na koje je dodavano po 500 µl prekonoćne kulture soja *Escherichia coli* OP50 gajenog u LB podlozi. Tako pripremljene podloge 20h su inkubirane na 37 °C i na njima su gajene nematode, do izleganja dovoljne količine jaja na 15 °C. Populacije crva su sinhronizovane da bi svi bili u stadijumu larve L4 po opisanom protokolu (Brackman *et al.*, 2011).

Sinhronizovana populacija crva je spirana M9 obogaćenom tečnom podlogom sa NGM čvrste podloge. Crvi su sakupljeni sa podloga u epruvete, ostatak M9 podloge je uklonjen, a crvi nataloženi na dnu epruvete su resuspendovani u svežoj M9 obogaćenoj podlozi, ispitivanje crva je ponavljano par puta, do momenta kada je M9 podloga ostala bistra. Potom je pravljena suspenzija crva, da na 25 µl bude od 25 do 35 crva (crvi su prebrojavani pod mikroskopom). U mikrotitracione ploče sa 96 bunara (Kartel, Italija) dodavano je po 50 µl M9 obogaćene podloge i poa 25 µl suspenzije crva kao i jedinejnja čija se toksičnost evaluirala u aktivnim koncentracijama (maksimalna koncentracija DMSO u kontroli 1%). Eksperiment je trajao sedam dana, svakod gana je praćeno preživljavanje crva pod stereomikroskopom (SMZ143-N2GG, Motic, Nemačka). Crvi koji se nisu kretali ni nakon stimulusa smatrani su mrtvim. Rezultati su predstavljani kao procenat preživelih crva u odnosu na ukupan broj crva. Preživljavanje crva je predstavljeno Kaplan-Majerovom krivom preživljavanja.

3.7.3. Ispitivanje toksičnosti jedinjenja na model sistemu embriona zebrice *Danio rerio*

Divlji soj zebrice (*Danio rerio*) koji je korišćen za testiranje toksičnosti jedinjenja dobijen je ljubaznošću dr Ane Cvejić (Wellcome Trust Sanger Institute, Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo). Zebrice su gajene u uzgajalištu za zebrice pod kontrolisanim sredinskim uslovima (temperatura vode 28 °C, svetlosni režim: 14 sati dan i 10 sati mrak) uz hranjene suvom hranom (TetraMin™ flakes, Tetra Melle, Nemačka) dva puta dnevno, odnosno svežim račićima *Artemia nauplii* jednom dnevno.

Nakon parenja adultnih ženki i mužjaka (odnos 1:2), dobijeni embrioni su sakupljeni i isprani od detritusa, a nakon toga selektovani samo oplođeni embrioni koji su raspoređeni po 10 u svakom bunaru mikrotitarske ploče sa 24 bunara (Sarstedt, Nemačka). Svaki bunar sadržao je tačno po 1 ml vode za embrione (0,2 g/l of Instant Ocean® Salt u destilovanoj vodi) i šest sati nakon oplodjenja embrioni su tretirani odabranim jedinjenjima u odgovarajućim koncentracijama (maksimalna koncentracija DMSO u kontroli 1%). Tokom pet dana praćena je pojava različitih morfo-fizioloških parametara u razviću embriona (Tabela 3)(Pavic *et al.*, 2019), da bi petog dana bilo evaluirano dejstvo testiranih jedinjenja na razvoj embriona zebrica (Slika 7)(Rossier *et al.*, 2019). Petog dana zebrice su anestezirane trikainom (200 µg/ml, Sigma-Aldrich, SAD) i posmatrane pod stereomikroskopom (SMZ143-N2GG, Motic, Nemačka).



Slika 7. Izgled zebrice pod mikroskopom sa naznačenim unutrašnjim organima 120 časova nakon fertilizacije čije promene se detektuju prilikom ispitivanja toksičnog dejstva jedinjenja. (Preuzeto i modifikovano iz publikacije Rossier *et al.*, 2019).

Celokupan eksperimentalni rad na modelu zebrića urađen je u skladu sa Evropskom direktivom (EU2010/63) i prema Pravilniku za rad sa oglednim životinjama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Tabela 3. Lista letalnih i teratogenih efekata koji su praćeni na embrionima *D. rerio* tokom 120 čpf (čpf – časova posle fertilizacije)

Kategorija	Razvojni proces	Vreme (čpf)			
		24	48	72	96-120
Letalni efekat	Koagulacija jaja (embriona) ^a	•	•	•	•
	Odsustvo formiraniha somita	•	•	•	•
	Rep nije odvojen	•	•	•	•
	Odsustvo kontrakcija srca		•	•	•
Teratogeni efekat	Malformacija glave	•	•	•	•
	Malformacija očiju ^b	•	•	•	•
	Malformacija sakula/otolita ^c	•	•	•	•
	Malformacija notohorde	•	•	•	•
	Malformacija repa ^d	•	•	•	•
	Skolioza	•	•	•	•
	Promena frekvence rada srca		•	•	•
	Odsustvo kaudalne cirkulacije		•	•	•
	Edem perikardijalne duplje	•	•	•	•
	Edem žumancetne kese	•	•	•	•
	Deformacija žumancetne kese	•	•	•	•
	Obojenost jetre				•
	Promene u veličini/dužini tela ^e	•	•	•	•

^a Zastoj u razvoju embriona (organogenezi)

^b Malformacije oka su detektovane kao promene u veličini i obliku oka

^c Odsustvo otolita ili prisustvo više od dva otolita u sakulusu. Redukcija ili uvećanje otolita i sakulusa.

^d Malformacije repa su detektovane kao promene u obliku i položaju repa u odnosu na kontrolne embrione.

^e Poremećaji rasta embriona su detektovani kao zastoj u razvoju embriona i povećanju njegove veličine (praćeno pre izleganja embriona, 24 spf i 48 čpf), odnosno dužine tela (praćeno odmah po izleganju i 72 čpf) korišćenjem svetlosnog mikroskopa (CKX41; Olympus, Japan).

(Preuzeto i modifikovano iz publikacije Pavic *et al.*, 2019.)

Izračunavanje koncentracije testiranog jedinjenja pri kojoj umire 50% embriona, LC₅₀ vrednost rađeno je u programu ToxRat, OECD 203 (Alsdorf, Nemačka).

3.8. Molekularno-biološke metode

3.8.1. Izolacija ukupne DNK

Za izolovanje ukupne DNK korišćen je komercijalni paket GeneJet DNA purification kit (Thermo Scientific, Litvanija).

Bakterijski soj od interesa, iz laboratorijske kolekcije mikroorganizama, je gajen u TSB hranljivoj podlozi (odjeljak 3.1.1) na 30 °C u trajanju od 48 sati nakon čega je DNK izolovana po uputstvu proizvođača i zatim čuvana na -20 °C.

3.8.2. Umnožavanje gena za 16S rRNK

Standardnom PCR (*eng.* Polymerase Chain Reaction) metodom iz izolovane ukupne DNK (odjeljak 3.9.1) umnožen je željeni gen. Sve potrebne komponente za ovu reakciju korišćene su iz KAPA 2G Robust Hot Start Ready Mix paketa (Kapa Biosystems, SAD), dok su univerzalni bakterijski prajmeri 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i 1492R (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3') su nabavljeni od kompanije Invitrogen (Kalifornija, SAD). Finalna zapremina PCR reakcije je bila 50 µl i sadržala je: 5× KAPA2G pufer 10 µl, 5× KAPA enhanser 10 µl, 10mM dNTP mix 1 µl, po 2,5 µl 10 µM svakog prajmera, KAPA2G Robust DNA polimeraza 0,2 µl i po 4 µl DNK matrice pripremljene na već opisan način (odjeljak 3.9.1). Program PCR reakcije je prikazan u Tabeli 4. Sve reakcije umnožavanja su urađene u PCR aparatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD).

Tabela 4. Uslovi PCR reakcije korišćeni za umnožavanje gena za 16S Rrnk

Temperatura	Vreme	Faza reakcije	Broj ciklusa
95°C	3 minuta	Denaturacija	1
95°C	15 sekundi	Umnožavanje	30
55°C	15 sekundi	(denaturacija DNK,	
72°C	1 min 30 sekundi	hibridizacija prajmera i elongacija)	
72°C	5 minuta	Finalna elongacija	1

Uspešnost PCR reakcija je proveravana elektroforezom na agaroznim gelom (odjeljak 3.8.3.) a po potrebi proizvodi su prečišćavani QIAquick PCR Purification paketom (QIAGEN HmbH, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

3.8.3. Agarozna gel elektroforeza

Totalna DNK i proizvodi PCR reakcije analizirani su horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu. Agarozni gel je pripremljen u TBE puferu (1%, v/v) koji se sastoji iz sledećih komponenti: 10,9 g/l TRIS (Serva, Nemačka), 5,56 g/l borne kiseline (Merck, Nemačka) i 0,93 g/l EDTA (Sigma-Aldrich, Nemačka). Etidijum bromid je dodavan u gel u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Na gel su nanošeni uzorci sa indikatorskom bojom u odnosu 1:5, a kao marker pokretljivosti korišćen je O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker (100–3000 bp; Fermentas UAB, Litvanija). Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 8 V po dužnom centimetru gela. Uzorak je detektovan na gelu osvetljavanjem ultraljubičastom svetlošću talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Nemačka).

3.8.4. Sekvenciranje gena 16S rRNK

Sekvenciranje PCR produkata rađeno je na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD), korišćenjem komercijalnog paketa za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, SAD).

Reakciona smeša je u 8 µl zapremine sadržala 3 µl Ready Reaction Mix, 1 µl prajmera 1492 R odnosno 27F u koncentraciji 3,2 pmol i prečišćeni PCR proizvod (DNK matrica) i to 1-2 ng na svakih 100 bp dužine PCR produkta. Reakcija sekvenciranja je urađena aparatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD), koristeći program naveden u Tabeli 5.

Tabela 5. Uslovi PCR reakcije za sekvenciranje

Temperatura	Vreme	Faza reakcije	Broj ciklusa
95°C	1 minut	Denaturacija	1
96°C	10 sekundi	Umnožavanje	
50°C	5 sekundi	(denaturacija DNK, hibridizacija	25
60°C	4 minuta	prajmera i elongacija)	

Produkti reakcije su prečišćavani dodavanjem 40 µl rastvora A (1,2 ml 3M CH₃COONa, pH 5,2; 25 ml etanola 96% (v/v); 5,8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta na 13000 obrt/min (Eppendorf Centrifuge 5415, Eppendorf, Nemačka). Nakon odlivanja supernatanta talog je ispiran dodavanjem 200 µl 70% (v/v) etanola i centrifugiranjem 10 minuta na 13000 obrt/min. Po odlivanju supernatanta korak ispiranja ponovljen je još jednom. Talog je osušen i rastvoren u 25 µl HiDi formamida (Applied Biosystems, SAD). Nakon prečišćavanja uzorci su analizirani na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer programom SeqAnalyzer, a analiza kvaliteta sekvenci proverena je u programu SeqMan Pro (DNASTAR Inc, SAD). Radi identifikacije bakterija dobijene sekvence su porećene sa sekvencama iz dostupne baze podataka (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) korišćenjem BLAST programa.

3.8.5. Analiza uticaja derivata 4-aminohinolina na ekspresiju gena uključenih u međubakterijsku komunikaciju

3.8.5.1. Izolacija ukupne RNK

Ukupna RNK slobodnoživućih bakterija izolovana je komercijalnim paketom GeneJetRNA purification kit (Thermo Scientific, Litvanija). Prekonoćna kultura *P. aeruginosa* PAO1 (odeljak 3.1.4) gajena u TSB podlozi u prisustvu jedinjenja čiji se uticaj ispituje, presejana je u svežu LB podlogu (100 µl prekonoćne kulture u 5 ml podloge) i gajena do dostizanja srednje logaritamske faze rasta (OD₆₀₀ od 0,5 do 0,7) pod istim uslovima (37 °C uz mešanje od 180 obrt/min).

Nakon inkubacije po 1 ml kulture je centrifugiran 10 minuta, 13000 obrt/min, 4 °C; u centrifugi Eppendorf 5145 D centrifuge (Eppendorf, Nemačka). Supernatant je odbačen, a nataložene bakterijske ćelije su resuspendovane u 100 µl TE pufera (Tris-EDTA; 10 mM Tris (Serva, Nemačka) i 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), pH 8,0).

3.8.5.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) na osnovu izolovane RNK

Sinteza cDNK se odvija u dve odvojene reakcije. U prvoj reakciji se koristi izolovana RNK (Odeljak 3.6.3.1.) u zapremini od 0,7 µg, prajmera 1 µg i dejonizovane vode od ukupne zapremine 12,5 µg. Ova smeša je inkubirana 5 minuta na 65 °C, a posle toga ostavljena da odstoji 5 minuta na 4 °C.

Ovim je prva reakcija završena, a koristi se totalna njena zapremina za drugu reakciju. U smešu prve reakcije je dodavano 4 µl reakcionog pufera, 0,5 µl ribobloka (40 U/µl), 2 µl dNTP mešavina (10 mM) i 1 µl enzima reverzna transkriptaza (200 U/µl). Totalna zapremina druge reakcije iznosila je 20 µl. Ova smeša se inkubirala na tri različite temperature, i to 10 minuta na 25 °C, pa 60 minuta na 45 °C i 10 minura na 70 °C. Ovim korakom je sintetisana cDNK, a uspešnost reakcije je proveravana PCR reakcijom sa specifičnim prajmerima za *rplU* gen komercijalnim paketom FastGene Taq DNA kit (Nippon Genetics, Japan). PCR reakcija je analizirana prevashodno horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu, što je opisano dalje u tekstu u odeljku 3.8.3.

3.8.5.3. Umnožavanje cDNK Real Time PCR metodom

Komplementarna DNK, sintetisana na opisan način (odjeljak 3.6.3.2.) rastvarana je u dejonizovanoj vodi i to u odnosu 1:64. Komponente za Real Time PCR metodu su nabavljene od Thermo Scientific proizvođača, a metoda je rađena po uputstvu proizvođača. Zapremina jedne reakcije je iznosila 10 µl i sadržala je: 1 µl cDNK, 0,5 µl reverznog prajmera, 0,5 µl forvard prajmera, 5 µl maxima Syber green/rox qPCR master mixa (2X) i 3µl dejonizovane vode. Reakcije su izvođene u aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) prema sledećim parametrima: 2 minuta na 50 °C, 10 minuta na 95 °C, 40 ciklusa na 95 °C 15 sekundi i 60 °C 1 minuta. Svaka reakcija je rađena u triplikatu, a u eksperiment su kao negativne kontrole bile uključene reakcije koje nisu sadržale cDNK matricu. Prajmeri korišćeni za umnožavanje ispitivanih gena signalnih puteva međubakterijske komunikacije (Tabela 6) konstruisani su u programu Primer3plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus) na osnovu sekvenci ispitivanih gena *P. aeruginosa* deponovanih u bazi podataka.

Kao referentni gen, koji se eksprimira na isti način u svim izolatima, korišćena je gen *rplU* koji kodira ribozomalni protein L21.

Tabela 6. Spisak prajmera koji su korišćeni za analizu gena signalnih puteva međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa*

Gen	GenBank oznaka	Oznaka prajmera	5'-3' sekvenca prajmera
<i>lasR</i>	AAG04819.1	LasR-F	TGGATGCTCAAGGACTACGC
		LasR-R	CCGAGCAGTTGCAGATAACC
<i>lasI</i>	AAG04821.1	LasI-F	GCACATCTGGGAACTCAGC
		LasI-R	TCATCTTCTCCACGCCTACG
<i>rhlR</i>	AAG06865.1	RhlR-F	CTCCTCGGAAATGGTGGTC
		RhlR-R	GCTCGAAGCTGGAGATGTTC
<i>rhlI</i>	AAG06864.1	RhlI-F	CTACCTGTGCAGCGAAACC
		RhlI-R	CCGTTGCGAACGAAATAGC
<i>rhlA</i>	AAG06867.1	RhlA-F	GAAAGCCAGCAACCATCAG
		RhlA-R	AGCTGCCGTTGATGAAATG
<i>rplU</i>	AAG07956.1	rplU-F	CGAATTCCTCAAGGTCGAGA
		rplU-R	GCTTCATGTGGTGCTTACGA
<i>pqsA</i>	AAG04385.1	PqsA – F	CAATACACCTCGGGTCCAC
		PqsA – R	TGCCATAGCCGAAGAACATC
<i>pqsR</i>	AAG04392.1	PqsR – F	CTGATCTGCCGGTAATTGG
		PqsR – R	ATCGACGAGGAACTGAAGA

Dužina produkata dobijenih umnožavanjem korišćenih prajmera se kretala od 151 do 220 bp (*lasR* – 160 bp; *lasI* – 164 bp; *rhlR* – 176 bp; *rhlI* – 195 bp; *rhlA* – 155 bp; *rplU* – 206 bp; *pqsA* – 154 bp; *pqsR* – 143 bp). Prvo je testirana efikasnost Real Time PCR sa prajmerima navedenim u Tabeli 6 i matricom koja je bila cDNK referentnog soja *P. aeruginosa* PAO1 u serijskim razblaženjima i konstruisana je standardna kriva.

Dobijeni rezultati su analizirani korišćenjem programa 7500 System Software (Applied Biosystem) i predstavljeni su kao $2^{-\Delta C_t}$, pri čemu je ΔC_t definisan kao razlika između C_t vrednosti ispitivanog i referentnog gena *rplU*. Definisano je nekoliko veličina potrebnih za analizu rezultata: 1) bazna linija (*eng.*baseline; inicijalni ciklus PCR u kojem postoji vrlo mala promena u jačini fluorescentnog signala, 2) prag (*eng.*threshold; linija koja prolazi kroz eksponencijalni deo krive umnožavanja analiziranih gena, 3) C_t vrednost (*eng.* Threshold cycle; broj ciklusa u kome fluorescenca preseca prag).

3.9. Statistička analiza rezultata

Za ispitivanje statistički značajnih rezultata dobijenih u ovoj studiji korišćen je Studentov t-test. Značajnost dobijenih vrednosti za inhibiciju formiranja biofilмова ramnolipidima je utvrđena na nivou od $p < 0,05$. U ostalim ispitivanjima (rasturanje formiranog biofilma ramnolipidima, inhibicija formiranja biofilмова *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina kao i njihov uticaj na produkciju elastaza i na međubakterijsku komunikaciju) značajnost dobijenih vrednosti je utvrđivana na nivou od $p < 0,05$, $p < 0,001$ i $p < 0,0001$. Statističke vrednosti za sve eksperimente dobijene su poređnjem srednjih vrednosti tretmana i odgovarajućih kontrola.

4. REZULTATI

4.1. Identifikacija jedinjenja prirodnog porekla sa sposobnošću inhibicije formiranja biofilмова kod patogenih bakterija

Kolekcija mikroorganizama Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu broji preko pet stotina izolata sakupljenih sa različitih lokaliteta kao što su Deliblatska peščara, Sićevačka klisura, Grdelička klisura, Aleksandrovac, Nacionalni park Durmitor, kao i iz rizosfera medicinski značajnih biljaka. Sa ciljem da se identifikuju sekundarni metaboliti zemljišnih bakterija koji imaju sposobnost da inhibiraju formiranje biofilмова kod patogenih bakterijskih vrsta za pretragu je nasumično izabrano 155 sojeva iz Laboratorijske kolekcije mikroorganizama. Izabrani sojevi su vodili poreklo iz rizosfere medicinski značajnih biljaka pri čemu je 25 sojeva uzorkovano iz rizosfere koprive (*Urtica dioica*), 47 iz maka (*Papaver somniferum*), 22 iz dobričice (*Gleichoma hederacea*), pet iz mahovine (*Bryophita* sp.), 33 iz kamilice (*Matricaria chamomila*), osam iz žalfije (*Salvia pratensis*), dok je 15 sojeva izolovano iz zemljišta uzorkovanog u selu Čumić, iz okoline Kragujevca, Srbija.

Svi bakterijski izolati su gajeni u dve različite tečne hranljive podloge (JS i ISP2, odeljak 3.1.1) kako bi se indukovala veća raznovrsnost produkovanih sekundarnih metabolita. Nakon sedam dana gajenja, iz ukupnih bakterijskih kultura ekstrahovani su sekundarni metaboliti pomoću organskog rastvarača etil acetata. Ovako dobijeni ukupni ekstrakti bakterija rastvarani su u rastvaraču DMSO i testirana je njihova sposobnost da inhibiraju formiranje biofilмова kod soja *P. aeruginosa* PAO1 pri koncentraciji od 500 µg/ml. Ekstrakt soja BV152.1, koji je izolovan iz rizosfere dobračice inhibirao je formiranje biofilмова kod *P. aeruginosa* PAO1 za 40%.

U cilju identifikacije soja BV152.1 sekvenciran je gen za 16S rRNK. Korišćenjem BLAST algoritma (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sekvenca 16S rRNK gena soja BV152.1 je poređena sa sekvencama deponovanim u bazama podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI; *eng.* National Center for Biotechnology Information).

Utvrđeno je da ova sekvenca pokazuje najveću sličnost sa sekvencama vrsta *Lysinibacillus ouembei*, *Lysinibacillus meyeri* i *Lysinibacillus odyssey* (Tabela 7). Sekvenca 16S rRNK gena BV152.1 soja je deponovana u GenBank bazi pod pristupnim brojem – KY933395 (*eng.* GenBank Accession No.).

Tabela 7. Najbolje preklapanje sekvence gena 16S rRNK soja BV152.1 sa sekvencama u GenBank bazi podataka

Sojevi	Pristupni broj	Pokrivenost (%)	Identičnost (%)
<i>Lysinibacillus louembei</i> NM73	NR_145586.1	100	99
<i>Lysinibacillus meyeri</i> WS4626	NR_117577.1	100	99
<i>Lysinibacillus odysseyi</i> YH2	KM873372.1	99	99

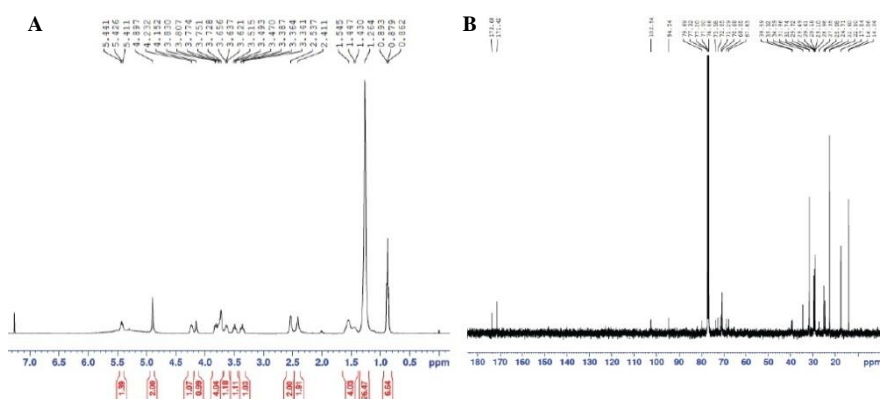
Da bi se identifikovalo aktivno jedinjenje iz ukupnog ekstrakta, soj BV152.1 je gajen po opisanim metodama (odjeljak 3.1.1) u 1 l hranjive podloge (4×250 ml), i nakon ekstrakcije etil acetatom (odjeljak 3.2.1.) dobijen je ekstrakt ukupne mase od 800 mg. Ekstrakt je prvo analiziran TLC metodom (odjeljak 3.2.2.1), gde je definisan optimalan sistem rastvarača (etil acetat:metanol 8:2) za frakcionisanje ekstrakta na gravitacionoj koloni, koji je korišćen za prečišćavanje aktivne komponente radi njene identifikacije. Nakon razdvajanja frakcija na gravitacionoj koloni, izdvojene su četiri frakcije (odjeljak 3.2.2.2) koje su testirane na sposobnost inhibicije formiranja biofilмова kod *P. aeruginosa* PAO1 ali je samo frakcija 4 (f4) pokazala sposobnost inhibicije.

Daljim razdvajanjem f4 izdvojile su se četiri frakcije (Slika 8), pri čemu je samo frakcija 3 (F3) dobijena sistemom rastvarača etil acetat : dihlormetan : metanol 4:2:1 bila aktivna. Masa ove frakcije iznosila je 96 mg, a njena inhibitorna aktivnost prema formiranju biofilмова kod *P. aeruginosa* PAO1 pri koncentraciji 50 µg/ml iznosila je 50%.



Slika 8. TLC pločica na koju je nanešena frakcija 4 (f4) u sistemu rastvarača etil-acetat:dihlormetan:metanol 4:2:1.

Frakcija F3 analizirana je nuklearnom magnetnom rezonantnom spektroskopijom (NMR). ^1H -NMR i ^{13}C -NMR spektari (Slika 9) su pokazali prisustvo lanaca masnih kiselina i ugljovodonične strukture. Hemijski pomeraj/pomak (δ) na 0,88 ppm ukazao je na postojanje terminalne metil grupe, a na 1,26 ppm postojanje metilenske grupe, što je potvrdilo da je u molekulu prisutan ravan lanac masnih kiselina. Ostali pomeraji u spektru ukazali su na poziciju ugljovodoničnih grupa. Na osnovu dobijenih parametara i literaturnih podataka (Sharma *et al.*, 2007) kao aktivani molekuli u frakciji F3 identifikovana je smeša ramnolipida koju su činili Rha-Rha-C10-C10 (63%), Rha-Rha-C10-C8 (17%), Rha-Rha-C10-C12 (17%) i monoramnolipidi (3%).



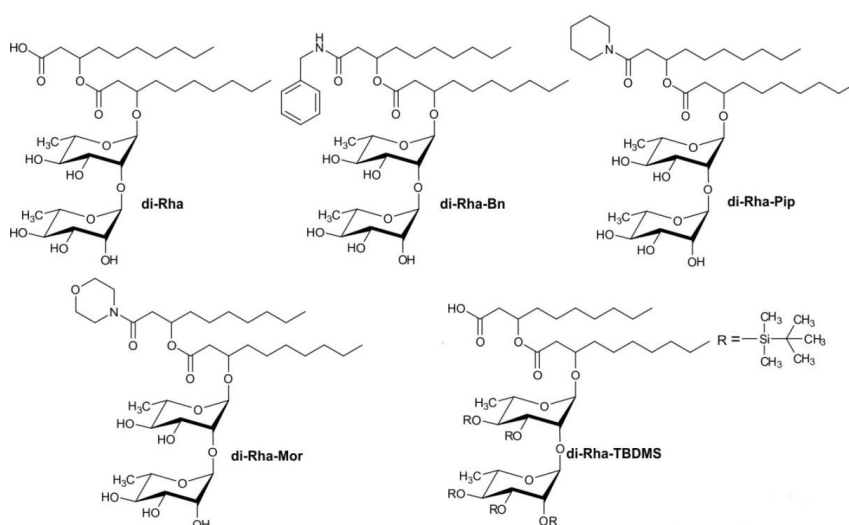
Slika 9. NMR spektari di-ramnolipida frakcije F3. A) spektar ^1H atoma iz di-ramnolipida, B) spektar ^{13}C atoma iz di-ramnolipida.

Ovi rezultati su potvrđeni poređenjem profila traka smeše ramnolipida iz soja *Lysinibacillus* sp. BV152.1 F3 sa komercijalno nabavljenom smešom ramnolipida poreklom od *P. aeruginosa* sp. (R90) koja je prečišćena do di-ramnolipida Rha-Rha-C10-C10 93% (u daljem tekstu R90-Rha) (Slika 10).



Slika 10. TLC pločica na koju su nanešeni s leva na desno smeša ramnolipida R90, prečišćeni di-ramnolipidi iz R90 i smeša ramnolipida frakcije F3.

Da bi se utvrdilo da li se strukturnim promenama di-ramnolipida može poboljšati njihova aktivnost, odnosno povećati aktivnost inhibicije formiranja biofilmova kod *P. aeruginosa* PAO1, sintetisana su po četiri amidna derivata di-ramnolipida polazeći od prečišćenih di-ramnolipida frakcije F3 (F3-Rha) i R90-Rha. Sintetisani su di-ramnolipidi sa benzenom (di-Rha-Bn), piperidinom (di-Rha-Pip) i morfolinom (di-Rha-Mor), kao i kontrolni derivat nastao kao međuproizvod derivatizacije, odnosno trimetil sililacije (di-Rha-TBDMS) (Slika 11).



Slika 11. Hemijske strukture di-ramnolipida, primer di-Rha-C10-C10 i njegovih derivata sintetisanih u ovoj studiji

Prvo su analizirane fizičko-hemijske karakteristike svih derivata di-ramnolipida, pri čemu su praćene vrednosti HLB (hidrofilno-lipofilna ravnoteža, *eng.* hydrophilic-lipophilic balance), pKa (konstanta disocijacije kiseline) i logP konstanti (particioni koeficijent). Parametar HLB predstavlja konstantu ravnoteže između hidrofilnosti i lipofilnosti, čija vrednost ukazuje na sposobnost hemijskog jedinjenja da se rastvori u vodi ili ulju. Vrednost HLB između 7-11 klasifikuje jedinjenje u surfaktante (jedinjenja koja smanjuju površinsku tenziju tečnosti), dok jedinjenja koja se klasifikuju kao emulzije vode u uljanoj materiji imaju vrednosti HLB između 4-6. Konstanta disocijacije ukazuje na odnos nedisosovane kiseline i njenog jona, pri čemu niže vrednosti na skali odgovaraju jakim kiselinama, a više slabijim kiselinama. Particioni koeficijent (logP) predstavlja odnos rastvorljivosti jedinjenja u dva rastvarača koja se ne mešaju (polarni i nepolarni rastvarač) i govori o meri rastvorljivosti jedinjenja. (Tabela 8).

Tabela 8. Fizičko-hemijski parametri di-ramnolipida i njihovih derivata

jedinjenje/derivat	HLB vrednost	pKa	logP
di-Rha	11,05	4,20	3,93
di-Rha-Bn	8,72	12,11	5,07
di-Rha-Pip	9,55	12,11	4,42
di-Rha-Mor	11,09	12,11	3,36
di-Rha-TBDMS	5,35	4,20	16,89

Svi derivati kao i polazni di-ramnolipidi imali su vrednost HLB koeficijenata između 8 i 11, što ukazuje da su ova jedinjenja po hemijskoj prirodi surfaktanti. Derivati su imali vrednost konstante disocijacije višu od 12 u odnosu na polazne di-ramnolipide kod kojih je vrednost pKa bila viša od 4 što je ukazivalo da su derivati manje kiseli od polaznih di-ramnolipida. Vrednosti logP kao mera hidrofilnosti jedinjenja pokazale su da su polazni di-ramnolipidi kao i njihovi derivati jednako dobro rastvorni u vodi, za razliku od kontrolnog derivata koji se pokazao najmanje rastvoran u odnosu na ostale derivate i polazne di-ramnolipide.

Pre ispitivanja anti-virulentnih svojstava ramnolipida, prečišćenih di-ramnolipida i njihovih derivata prvo je testirana njihova antibakterijska aktivnost na *P. aeruginosa* PAO1 i kliničkom izolatu *P. aeruginosa* DM50. Klinički izolat *P. aeruginosa* DM50 izabran je na osnovu sposobnosti da proizvodi dva puta više biofilma nego soj PAO1.

Pored toga ovaj soj sintetiše 2,5× više pocijanina u odnosu na PAO1, a i pokazao je znatno veći infektivni potencijal na model sistemima embriona zebra ribica i *C. elegance* (Milivojevic *et al.*, 2018). Pored sojeva roda *Pseudomonas* ispitivanja su rađena i na Gram negativnom patogenu *S. marcescens*.

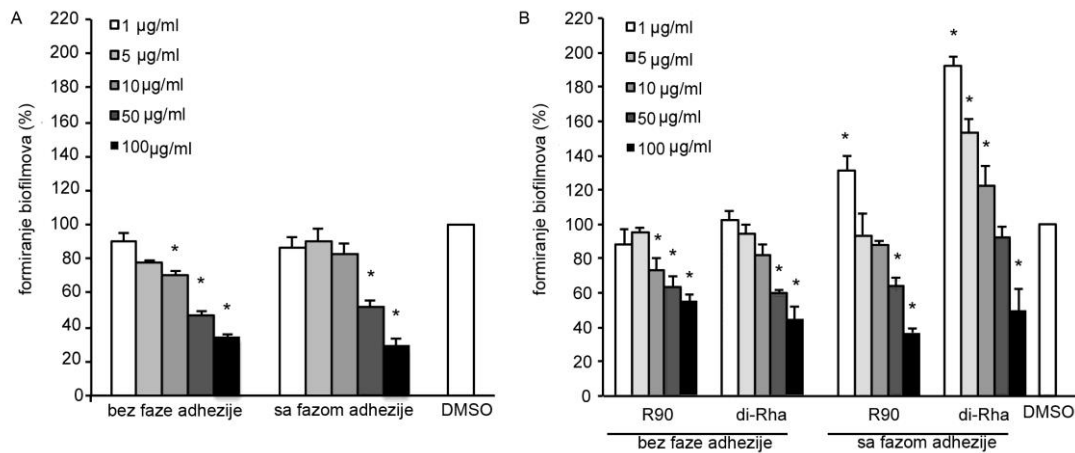
Nijedan od testiranih ramnolipida, uključujući smeše, prečišćene di-ramnolipide kao i njihove derivate, nisu pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) svih di-ramnolipida bile su veće od 500 µg/ml.

4.1.2. Anti-biofilm aktivnost ramnolipida i derivatia di-ramnolipida

Anti-biofilm aktivnost ramnolipida ispitivana je praćenjem njihovog uticaja na procese formiranja biofilмова, na fazu adhezije u procesu formiranja biofilмова, kao i njihov efekat na već formirane biofilmove, tj. testiran je i njihov potencijal da rasture biofilmove na soju *P. aeruginosa* PAO1. Na kliničkom izolatu *P. aeruginosa* DM50 i *S. marcescens* ATCC 27117 testiran je uticaj di-ramnolipida na formiranje biofilмова, kao i njihova uspešnost u rasturanju već formiranih biofilмова.

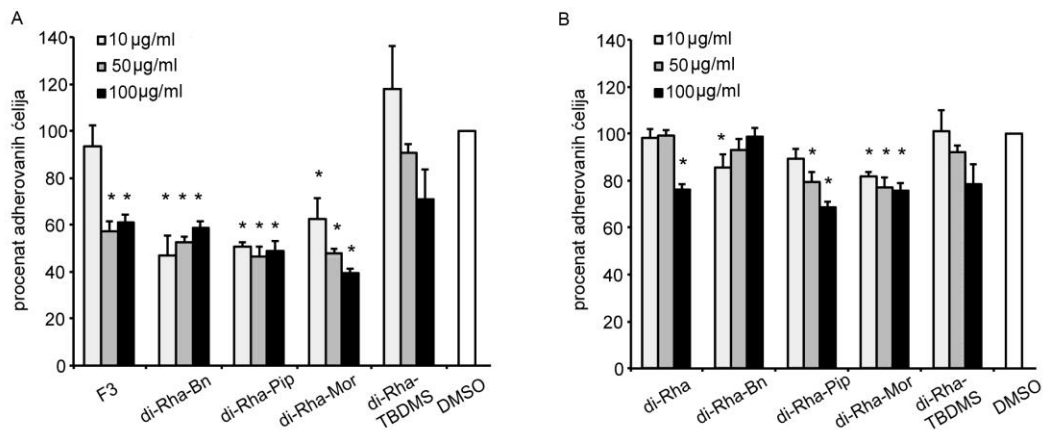
Ramnolipidi frakcije F3 pokazali su dozno-zavisno inhibitorno dejstvo na formiranje biofilma kod *P. aeruginosa* PAO1 sa BFIC₅₀ vrednošću (koncentracija na kojoj je formiranje biofilмова inhibirano za 50%) od 50 µg/ml (Slika 12), a za R90-Rha BFIC₅₀ vrednost je iznosila 75 µg/ml. Da bi utvrdili na koju fazu procesa formiranja biofilмова *P. aeruginosa* PAO1 deluju ramnolipidi testiran je njihov uticaj na fazu adhezije za podlogu kao i na rast biofilмова. U prvoj analizi bakterijska kultura je koinkubirana sa ramnolipidima od samog početka procesa formiranja biofilмова, tj. u fazi adhezije i u fazi rasta, a u drugoj je bakterijama prvo omogućeno da adheriraju za podlogu bez prisustva ramnolipida, potom su nevezane ćelije bile uklonjene ispiranjem, da bi rast biofilмова bio praćen u prisustvu ramnolipida. Bez obzira na to da li je smeša ramnolipida F3 bila prisutna ili ne tokom faze adhezije, nije uočena razlika u formiranju biofilмова, što ukazuje da je u pitanju inhibitorna aktivnost na rast biofilмова (Slika 12). U ispitivanju uticaja komercijalno nabavljene smeše ramnolipida poreklom od *P. aeruginosa* sp. (R90) na fazu adhezije pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 100 µg/ml smeša ramnolipida inhibirala je formiranje biofilмова za oko 60%, a prečišćeni di-ramnolipidi za 50%. Pri koncentraciji od 50 µg/ml smeša di-ramnolipida R90 inhibirala je rast biofilмова oko 30%, dok prečišćeni di-ramnolipidi nisu bili aktivni.

Na nižim koncentracijama efekat jedinjenja na formiranje biofilmova je bilo stimulativno (Slika 12).



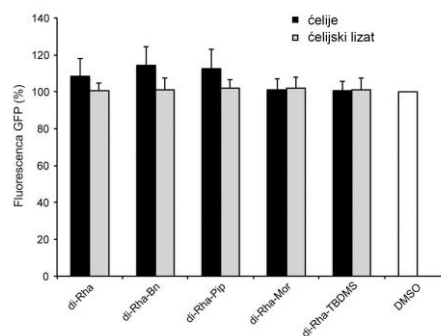
Slika 12. Ispitivanje uticaja smeše ramnolipida i prečišćenih di-ramnolipida na formiranje biofilmova *P. aeruginosa* PAO1 u esejima sa i bez faze adhezije. A) Formiranje biofilmova u prisustvu smeše ramnolipida frakcije F3, i B) formiranje biofilmova u prisustvu smeše ramnolipida R90 kao i R90-Rha. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta ± standardna devijacija. * $P < 0,05$.

Efekat di-ramnolipida i njihovih derivata na proces adhezije bakterija za podlogu praćen je u eksperimentima sa sojem *P. aeruginosa* PAO1 koji je ekspimirao zeleni fluorescentni protein. Derivati F3-Rha sa benzenom i piperadinom inhibirali su adheziju za 50% pri koncentracijama od 10 µg/ml, dok je di-Rha-Mor ima isti efekat pri koncentraciji od 50 µg/ml. Derivati R90-Rha pokazali su manju sposobnost inhibicije adhezije u odnosu na F3 kao i na F3-Rha derivate (Slika 13) – u koncentraciji od 100 µg/ml R90-Rha inhibirao je proces adhezije za 25%, dok je u istoj koncentraciji di-Rha-Pip R90 inhibirao proces za 30%.



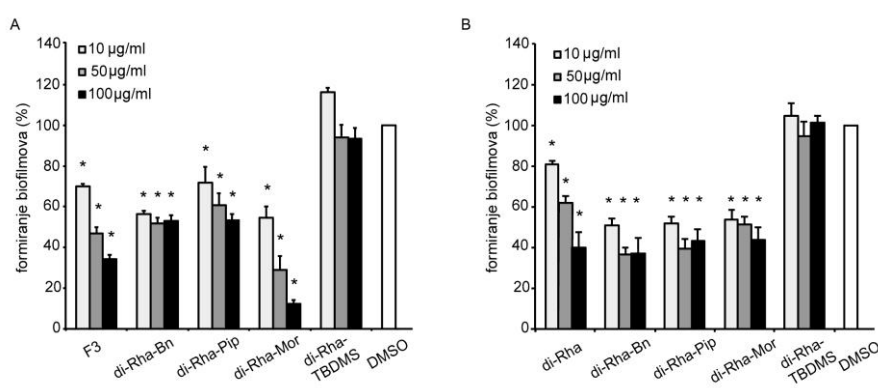
Slika 13. Uticaj di-ramnolipida i njihovih derivata na adheziju *P. aeruginosa* PAO1 pBBR2-GFP. Adhezija bakterija u prisustvu A) F3 i F3-Rha derivate i B) Adhezija bakterija u prisustvu R90-Rha i njihovih derivata. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija. * $P < 0,05$.

Da bi se isključila mogućnost da di-ramnolipidi utiču na ekspresiju GFP proteina i njegovu fluorescenciju, kultura *P. aeruginosa* PAO1 pBBR2-GFP gajena je u prisustvu di-ramnolipida ili njihovih derivata, nakon čega je izmerena apsorbancija i fluorescencija ćelija. Takođe, kultura *P. aeruginosa* PAO1 pBBR2-GFP je sonifikovana da bi se oslobodio sadržaj ćelija, a zatim je fluorescencija izmerena pre i po dodavanju di-ramnolipida i derivata. Ni u jednom slučaju prisustvo di-ramnolipida i njihovih derivata nije uticalo na fluorescenciju zelenog fluorescentnog proteina (Slika 14).



Slika 14. Efekti di-ramnolipida i njihovih derivata na ekspresiju GFP fluorescentnog proteina i njegovu fluorescenciju. Fluorescencija ćelija je izražena kao fluorescencija zavisna od gustine bakterijske kulture. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija.

Di-ramnolipidi i njihovi derivati pokazali su dozno-zavisnu sposobnost inhibicije formiranja biofilmova kod *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 15). Di-Rha-Mor F3 sa $BFIC_{50}$ od 12,5 $\mu\text{g/ml}$ se pokazao kao potentniji inhibitor formiranja biofilmova *P. aeruginosa* PAO1 u odnosu na izvornu smešu ramnolipida F3, dok je u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/ml}$ derivat di-Rha-Mor F3 inhibirao formiranje biofilmova za 90%. Derivati di-Rha-Bn F3 i di-Rha-Pip F3 sa $BFIC_{50}$ vrednosti od 100 $\mu\text{g/ml}$ su bili manje aktivni u poređenju sa di-Rha F3. Derivatizacijom R90-Rha povećana je njihova sposobnost inhibicije formiranja biofilmova, tako da su $BFIC_{50}$ vrednosti i za di-Rha-Bn i di-Rha-Pip iznosile 10 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 15. Uticaj di-ramnolipida i njihovih derivata na proces formiranja biofilmova kod *P. aeruginosa* PAO1. Biofilmovi su formirani u prisustvu di-ramnolipida i njihovih derivata poreklom iz A) *Lysinibacillus* sp. BV152.1 i B) R90. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija. * $P < 0,05$.

Kao najpotentniji inhibitor formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1 izdvojio se di-Rha-Mor F3 koji je inhibirao formiranje biofilmova za 80% pri koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$. Inhibitorne aktivnosti di-Rha-Pip i di-Rha-Bn bile su niže ili iste od F3-Rha. Derivati R90-Rha, di-Rha-Bn i di-Rha-Pip su se pokazali kao aktivniji inhibitori u poređenju sa istim derivatima iz F3-Rha, dok je di-Rha-Mor R90 inhibirao je formiranje biofilmova za 50% i kao takav bio manje potentan od odgovarajućeg derivata poreklom iz BV152.1 izolata. Ni jedan od kontrolnih derivata di-ramnolipida nije bio aktivan kao inhibitor formiranja biofilma kod *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 9).

Tabela 9. Formiranje biofilma u prisustvu di-ramnolipida F3 i R90.

od 50 µg/ml		<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> DM50	<i>S. marcescens</i> ATCC 27117
F3 Rha	di-Rha (F3)	50 ± 5	45 ± 3	38 ± 13
	di-Rha-Bn	60 ± 2	42 ± 2	20 ± 4
	di-Rha-Pip	50 ± 2	48 ± 4	20 ± 4
	di-Rha-Mor	20 ± 3	35 ± 8	12 ± 1
	di-Rha-TBDMS	115 ± 10	100 ± 8	85 ± 1
	Smeša ramnolipida (R90)	54 ± 5	76 ± 8	15 ± 2
R90 Rha	di-Rha (R90)	50 ± 3	109 ± 10	20 ± 5
	di-Rha-Bn	36 ± 3	168 ± 3	50 ± 7
	di-Rha-Pip	39 ± 4	94 ± 13	20 ± 3
	di-Rha-Mor	50 ± 4	76 ± 7	14 ± 1
	di-Rha-TBDMS	95 ± 7	73 ± 6	117 ± 4

*Vrednosti su izražene u procentima i predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta ± standardna devijacija

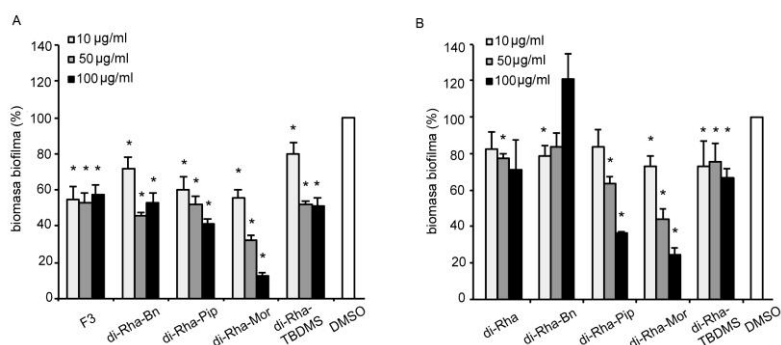
Značajna razlika u vrednostima inhibicije formiranja biofilмова u prisustvu di-ramnolipida i derivata frakcije F3 i R90 uočena je kod kliničkog soja *P. aeruginosa* DM50. F3-Rha inhibirali su formiranje biofilмова kliničkog soja za 55% pri koncentraciji od 50 µg/ml, a njegovi derivati di-Rha-Bn i di-Rha-Pip za 58% i 52%. Di-Rha-Mor F3 se pokazao kao najaktivniji derivat na *P. aeruginosa* DM50 sa inhibicijom formiranja biofilмова od 65%. R90-Rha nisu uticali na formiranje biofilмова ovog soja, osim di-Rha-Mor koji je sprečavao formiranje biofilmove za 24%. Kontrolni ramnolipid di-Rha-TBDMS R90 je pokazao malu inhibitornu sposobnost formiranja biofilмова kod ovog soja, za razliku od kontrolnog derivata F3 koji je bio potpuno neaktivan.

Di-ramnolipidi i njihovi derivati pokazali su najveći efekat prilikom sprečavanja formiranja biofilмова *S. marcescens*. F3-Rha pri koncentraciji od 50 µg/ml inhibirali su formiranje biofilмова *S. marcescens* za 62%, a njihovom derivatizacijom inhibitorna aktivnost se povećala do 80% kod di-Rha-Bn i di-Rha-Pip, dok je di-Rha-Mor bio najaktivniji sa 88% inhibicije. Smeša ramnolipida R90 inhibirala je formiranje biofilмова *S. marcescens* do 85%, prečišćeni di-ramnolipidi do 80%, dok je di-Rha-Mor bio najaktivniji derivat sprečavajući formiranje biofilмова do 86%.

S obzirom na značaj jedinjenja sa sposobnošću da rasture već formirani biofilm u medicinskom smislu, ispitan je efekat ramnolipida i derivata di-ramnolipida na preformirani biofilm. Uticaj di-ramnolipida i njihovih derivata na rasturanje biofilмова testirano je na istim bakterijskim sojevima na kojima je utvrđena njihova sposobnost inhibicije formiranja biofilмова.

Koncentracije jedinjenja na kojima se 50% formiranog biofilma rasturi (BDIC₅₀) utvrđene su za najaktivnija jedinjenja na soju *P. aeruginosa* PAO1.

Ramnolipidi frakcije F3 u koncentraciji od 10 µg/ml rasturaju 50% formiranog biofilma soja *P. aeruginosa* PAO1, dok R90-Rha rasture tek 20% formiranog biofilma pri koncentraciji od 100 µg/ml (Slika 16). Di-Rha-Mor F3 ima najnižu vrednost BDIC₅₀ od 12,5 µg/ml, dok za isti tip derivata R90-Rha ta koncentracija iznosi 50 µg/ml. Oba derivata primenjena u koncentraciji od 100 µg/ml su rasturala 80% formiranog biofilma (Slika 16). Kontrolni derivati nisu uticali na rasturanje biofilma *P. aeruginosa* PAO1.



Slika 16. Uticaj di-ramnolipida i njihovih derivata na proces rasturanja biofilмова *P. aeruginosa* PAO1. A) F3 i derivati F3-Rha i, B) R90-Rha i njegovi derivati. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta ± standardna devijacija. *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,0001.

Najuspešnije rasturanje formiranih biofilмова di-ramnolipidima i njihovim derivatima uočeno je na soju *P. aeruginosa* PAO1. Ramnolipidi frakcije F3 rasturali su biofilmove za 47% pri koncentraciji od 50 µg/ml, a di-Rha-Mor F3 za 68% (Tabela 10). Takođe, di-Rha-Mor R90 je pokazao najveću sposobnost rasturanja biofilмова, pri čemu je na koncentraciji od 50 µg/ml rastureno 56% biofilma, što je najveća aktivnost među derivatima R90-Rha. Može se izdvojiti i di-Rha-Pip R90 koji je rasturio biofilm za 37% pri istoj koncentraciji.

Ramnolipidi frakcije F3 nisu pokazali sposobnost da rasture formirani biofilm kliničkog soja *P. aeruginosa* DM50, dok se sa derivatizacijom F3-Rha njihova sposobnost da rasturaju biofilmove ovog soja povećala. Di-Rha-Pip F3 u koncentraciji od 50 µg/ml rastura 33% formiranog biofilma, što je i najveća aktivnosti za derivate F3-Rha. Takođe R90-Rha nisu pokazali sposobnost rasturanja formiranog biofilma u koncentraciji od 50 µg/ml, dok se uvođenjem piperidina efikasnost di-ramnolipida u rasturanju biofilma povećala na 41%. Di-Rha-Mor R90 su pokazali da mogu da rasture do 33% već formiranog biofilma, a di-Rha-Bn do 30%.

Kontrolni derivati na *P. aeruginosa* PAO1 i kliničkom soju *P. aeruginosa* DM50 rasturali su biofilm samo do 20%. Di-ramnolipidi i njihovi derivati pokazali su najmanju sposobnost da rasture biofilmove soja *S. marcescens* ATCC 27117. Di-ramnolipidi iz oba izvora nisu rasturali biofilm u koncentraciji od 50 µg/ml, dok su derivati F3-Rha, di-Rha-Bn i di-Rha-Mor rasturali formirani biofilm za 63% odnosno za 58%, što su i najviše dobijene vrednosti na ovom soju. Derivati R90-Rha nisu rasturali biofilm, već su na protiv stimulisali njegovo formiranje.

Tabela 10. Biomasa biofilma nakon delovanja F3-Rha i R90-Rha kao i njihovih derivata.

50 µg/ml		<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> DM50	<i>S. marcescens</i> ATCC 27117
F3 Rha	di-Rha (F3)	53 ± 5	108 ± 7	243 ± 3
	Rha-Bn	46 ± 2	74 ± 4	37 ± 2
	Rha-Pip	52 ± 5	67 ± 4	180 ± 7
	Rha-Mor	32 ± 2	75 ± 8	42 ± 4
	Rha-TBDMS	80 ± 6	65 ± 1	99 ± 8
R90 Rha	di-Rha (R90)	77 ± 3	135 ± 10	193 ± 8
	Rha-Bn	84 ± 8	70 ± 6	239 ± 15
	Rha-Pip	63 ± 4	59 ± 5	175 ± 18
	Rha-Mor	44 ± 6	67 ± 8	160 ± 8
	Rha-TBDMS	76 ± 10	78 ± 10	155 ± 3

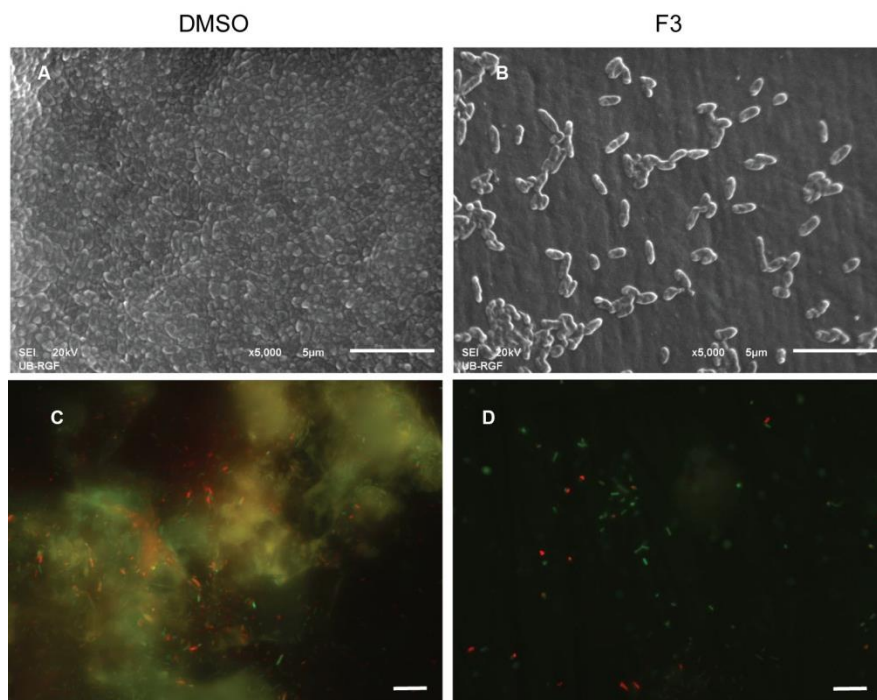
*Vrednosti su izražene u procentima i predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta ± standardna devijacija

Biofilmovi na kateterima i drugim medicinskim pomagalicama su česta pojava u medicinskoj praksi, naročito kod njihove dugotrajne primene. Sposobnost F3-Rha da inhibiraju formiranje biofilмова *P. aeruginosa* PAO1 na medicinskim kateterima praćena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (Slika 17, A i B), dok je inhibiranje formiranja biofilмова formiranih na staklenim površinama praćena fluorescentnom mikroskopijom, preparati su obojeni SYTO[®] 9 (zelena) i PI (crvena) fluorescentnim bojama (Slika 17, C i D).

Na slici 17A može se videti konfluentan sloj bakterija iz biofilma formiranog na površini katetera u prisustvu rastvarača DMSO. U prisustvu F3-Rha (Slika 17B) biofilm se nije formirao na površini katetra što se uočava po prisustvu malobrojnih, nasumično raspoređenih pojedinačnih ćelija na površini katetera.

Na slici 16C vidi se formirani biofilm u prisustvu DMSO, pri čemu se lako uočavaju žive i mrtve bakterije, odnosno zelene i crvene pojedinačne ćelije uronjene u ekstracelularni matriks biofilma koji izgleda kao narandžasti oblak preko ćelija.

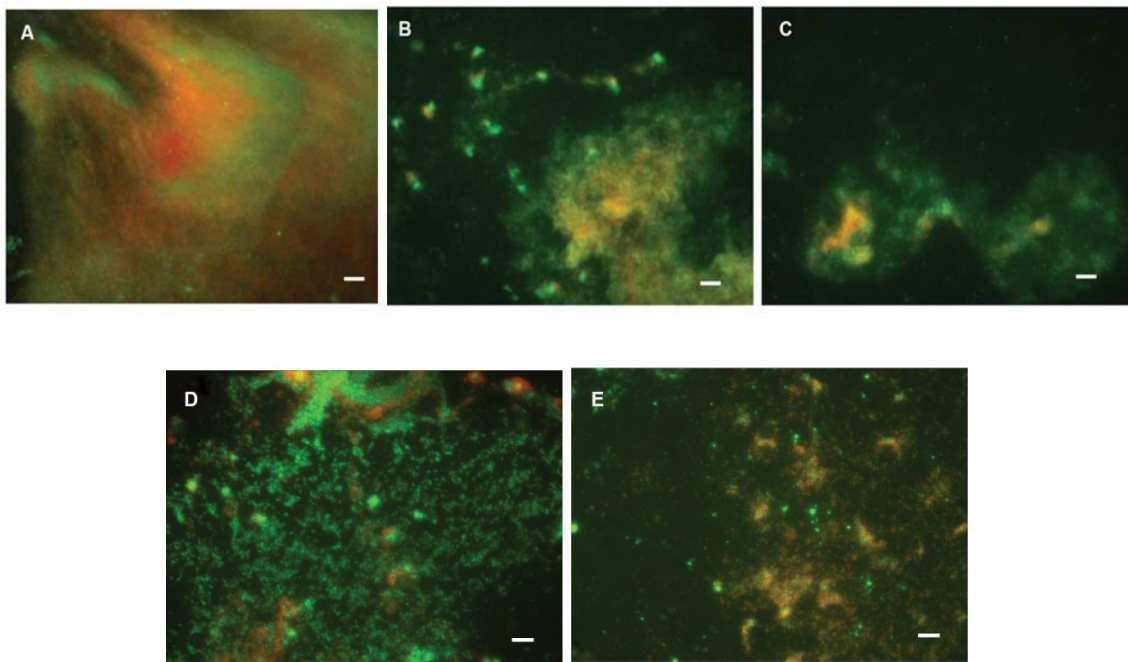
Narandžasta boja je posledica bojenja ekstraćelijske DNK zelenom i crvenom bojom, odnosno SYTO[®]9 i PI. U prisustvu di-ramnolipida F3 na pokrovnom stakliću se ne uočava prisustvo biofilma, već samo pojedinačnih živih i mrtvih bakterija (Slika 17D).



Slika 17. Inhibicija formiranja biofilma kod *P. aeruginosa* PAO1 u prisustvu F3-Rha. (A) Skenirajuća elektronska mikrofografija biofilma *P. aeruginosa* PAO1 na medicinskom kateteru u prisustvu DMSO-a i (B) F3-Rha u njihovim BFIC₅₀ koncentracijama. (C) Fluorescentna mikrofografija biofilma *P. aeruginosa* PAO1 na pokrovnom staklu u prisustvu DMSO-a i (D) F3-Rha u BFIC₅₀ koncentraciji. Biofilmovi su obojeni fluorescentnim bojama SYTO[®]9 (zeleno) i PI (crveno) (C i D). Razmernik na mikrofografijama dobijenim skenirajućom elektronskom mikroskopijom označava 5 μm, a fluorescentnom mikroskopijom 10 μm.

Anti-biofilm aktivnost najaktivnijih derivata di-ramnolipida, di-Rha-Mor F3 i di-Rha-Mor R90, kao i nederivatizovanih di-ramnolipida analizirana je tehnikama fluorescentne mikroskopije (Slika 18). Na kontrolnoj mikrofografiji, na kojoj se biofilm formirao u prisustvu rastvarača DMSO (Slika 18A), uočava se gust biofilm kojeg čine žive i mrtve bakterije, kao i matriks biofilma, u vidu obojene eDNK.

U prisustvu di-Rha i di-Rha-Mor u koncentracijama koje ogovaraju njihovim BFIC₅₀ vrednostima na preparatima se uočava značajno manja količina formiranih biofilma. Takođe se može uočiti i veća aktivnost oba di-Rha-Mor derivata u poređenju sa polaznim smešama di-ramnolipida.



Slika 18. Inhibicija formiranja biofilмова kod *P. aeruginosa* PAO1 u prisustvu di-ramnolipida F3-Rha i R90-Rha kao i njihovih derivata sa morfolinskom grupom pri BFIC₅₀ koncentracijama, detektovana fluorescentnom mikroskopijom. A) Kontrolna mikrofotografija, biofilm *P. aeruginosa* PAO1 formiran na plastičnom mikroskopskom preparatu u prisustvu DMSO. Biofilmovi formirani u prisustvu F3-Rha (B) i derivata sa morfolinskom grupom F3 (C), odnosno u prisustvu R90-Rha (D) i derivata sa morfolinskom grupom R90-Rha (E). Biofilmovi su obojeni fluorescentnim bojama SYTO®9 (zeleno) i PI (crveno). Razmernik predstavlja 10 µm.

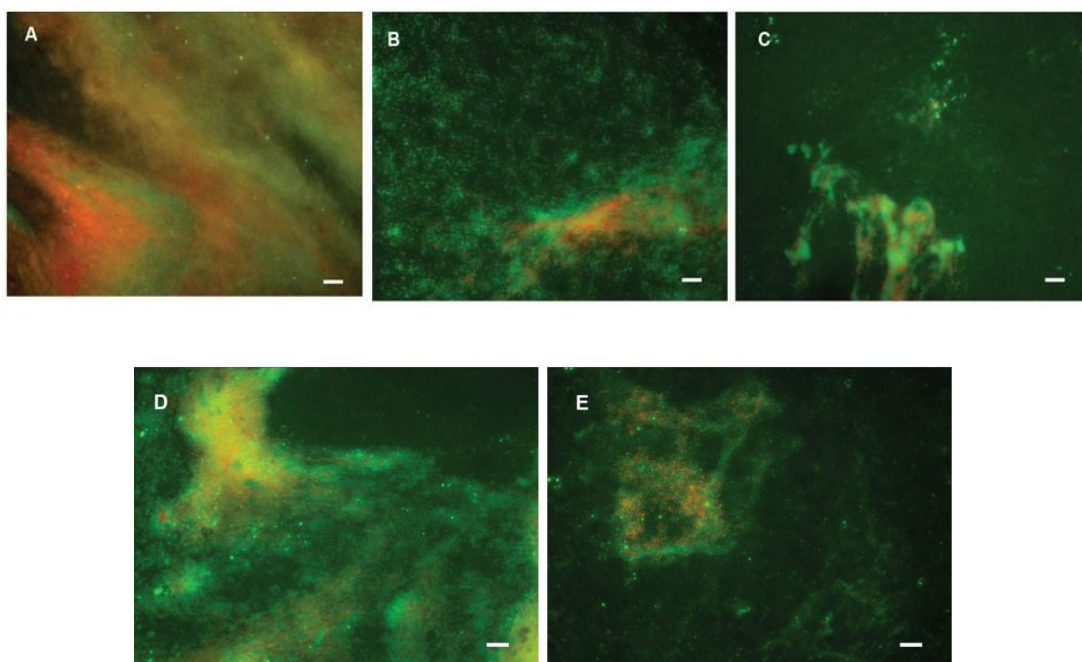
Sposobnost di-ramnolipida i derivata sa morfolinskom grupom da rasture već formirani biofilm potvrđena je fluorescentnom mikroskopijom (Slika 19). Biofilmovi su formirani 24 h, a zatim su, nakon uklanjanja planktonskih ćelija, bili izloženi dejstvu di-Rha i di-Rha-Mor iz *Lysinibacillus* sp. odnosno R90 u koncentracijama BDIC₅₀.

Na kontrolnoj mikrofotografiji (Slika 19A) uočava se biofilm tretiran samo DMSO rastvaračem. Formiran je kompaktan biofilm sa gustim matriksom ispod koga se mogu videti pojedinačne zelene i crvene, odnosno žive i mrtve bakterije. Mikrofotografije 19B i 19C predstavljaju biofilm zaostao nakon tretmana di-Rha F3 i di-Rha-Mor F3 di-ramnolipidima, pri čemu se može uočiti značajno veća sposobnost di-Rha-Mor da rasturi biofilm u odnosu na nederivatizovane di-ramnolipide. Važno je naglasiti da su bakterije nakon tretmana di-ramnolipidima većim delom žive i da crvena boja PI potiče samo od bojenja ostataka eDNA iz matriksa biofilмова. Na mikrofotografiji 19B (tretman di-Rha F3) se u donjoj desnoj polovini uočava mali ostatak biofilma, obojen zelenom i crvenom bojom, a takođe se uočava i žuta boja nastala kao posledica mešanja signala.

Na ostatku mikrografije u velikom broju se nalaze pojedinačne ćelije zelene boje, gusto zbijene.

Primenom di-Rha-Mor F3 pojedinačnih ćelija je znatno manje (Slika 19C), a ostatak rasturenog biofilma vidljiv je samo u donjem delu delu preparata. Zelena boja je najzastupljenija na ovom preparatu, što ukazuje na to da je većina ćelija i dalje živa.

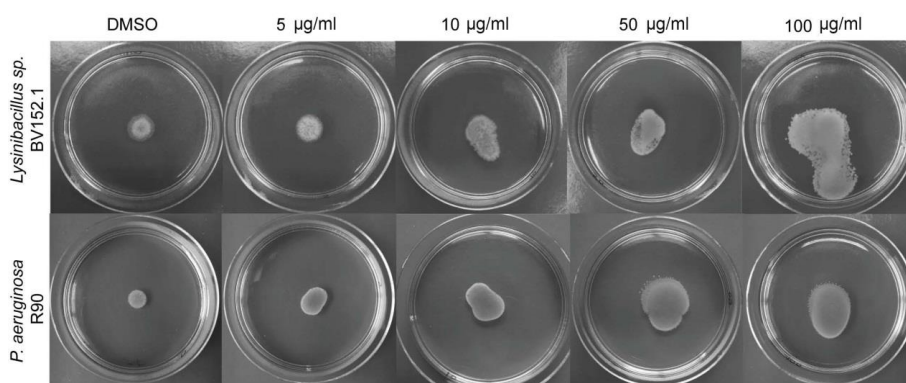
Na mikrografijeama 19D i 19E prikazane su sposobnosti di-ramnolipida di-Rha R90 i di-Rha-Mor R90 da rasture formirani biofilm *P. aeruginosa* PAO1. Di-ramnolipidi R90 su demonstrirali značajno manju sposobnost da rasture biofilm u poređenju sa derivatom di-Rha-Mor R90. Kao i u slučaju di-ramnolipida iz F3, nakon tretmana di-ramnolipidima i morfolinskim derivatom di-ramnolipida R90 većina bakterija se boji zelenom bojom, dok se ostaci matriksa biofilma uočavaju kao narandžasti oblak preko pojedinačnih ćelija.



Slika 19. Uticaj di-ramnolipida na rasturanje formiranih biofilмова kod *P. aeruginosa* PAO1. A) Kontrolna mikrografija, formirani biofilm *P. aeruginosa* PAO1 tretiran DMSO-om, B) Formirani biofilm tretiran F3-Rha, C) Formiran biofilm tretiran di-Rha-Mor F3, D) Formiran biofilm tretiran R90-Rha, E) Formiran biofilm tretiran di-Rha-Mor R90. Ramnolipidi i njihovi derivati su primenjeni u BFDC₅₀ koncentracijama. Biofilmovi su obojeni fluorescentnim bojama SYTO[®] 9 (zeleni) i PI (crveni). Razmernik predstavlja 10 μm.

4.1.3. Uticaj di-ramnolipida na kretanje rojenjem *P. aeruginosa* PAO1

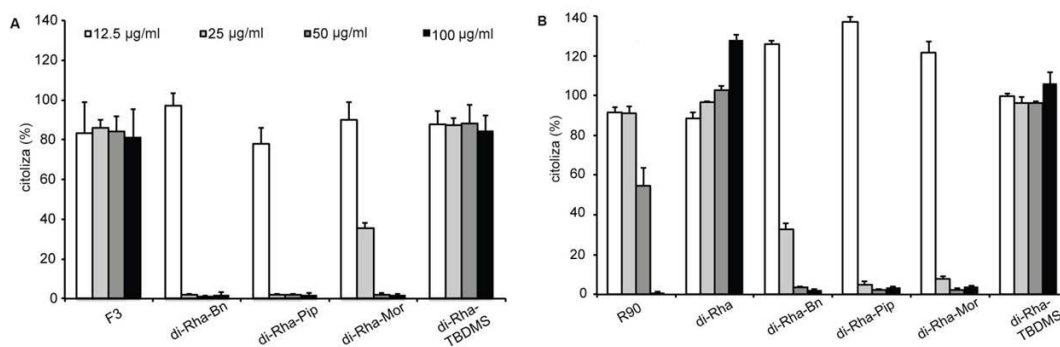
Nakon potvrđene anti-biofilm aktivnosti di-ramnolipida, testiran je njihov uticaj na rojenje *P. aeruginosa* PAO1. Rojenje je regulisano PQS sistemom međubakterijske komunikacije i stimulisano je ramnolipidima, proizvodima sekundarnog metabolizma *P. aeruginosa* PAO1, čime se omogućava otpuštanje pojedinačnih bakterija iz biofilma, odnosno disperzija. Prisustvo F3-Rha i R90-Rha u podlozi stimulisalo je rojenje, pri čemu je najveći efekat ostvaren primenom F3-Rha u koncentraciji od 100 µg/ml. Iako je isti efekat uočen u prisustvu R90-Rha stimulacija rojenja imala je slabiju doznu zavisnost (Slika 20).



Slika 20. Uticaj smeša ramnolipida iz F3 i R90 na rojenje *P. aeruginosa* PAO1.

4.1.4. Ispitivanje citotoksičnosti testiranih ramnolipida

Citotoksičnost ramnolipida i njihovih derivata ispitana je na ćelijama fibroblasta pluća (MRC5) MTT metodom kojom se detektuje metabolička aktivnost ćelija. Smeša ramnolipida iz *Lysinibacillus* sp. nije pokazala citotoksičnost u koncentracijama do 100 µg/ml dok je uvođenje amidnih grupa dovelo do citotoksičnosti već na koncentracijama od 25 µg/ml. Dok je smeša ramnolipida R90 citotoksična u koncentracijama od 50 µg/ml i 100 µg/ml. R90-Rha nisu citotoksični, ali se derivatizacijom citotoksičnost pojavila. Kontrolni derivati nisu pokazali citotoksično dejstvo ni na jednoj ispitivanoj koncentraciji (Slika 21).



Slika 21. Citotoksičnost ramnolipida, di-ramnolipida i njihovih derivata na ćelijskoj liniji MRC5, mereno MTT metodom nakon 48 sati tretmana. A) Di-ramnolipidi iz F3 Rha i njihovi derivati, B) di-ramnolipidi iz R90 Rha i njihovi derivati. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta ± standardna devijacija.

4.2. Hemijski sintetisana jedinjenja sa inhibitornim dejstvom na virulentne karakteristike patogenih bakterija

Strukture prirodnih i sintetičkih bioaktivnih molekula koriste se kao osnova za sintezu novih jedinjenja u cilju povećanja anti-virulentne aktivnosti. Kod *P. aeruginosa* jedinjenja koja su o strukturi slična prirodnim autoinducerima sistema međubakterijske komunikacije pokazala su se kao inhibitori faktora virulencije velikog potencijala. Takođe, pokazano je da je dalja derivatizacija ovih jedinjenja dobra strategija za dobijanje jedinjenja sa većom aktivnošću.

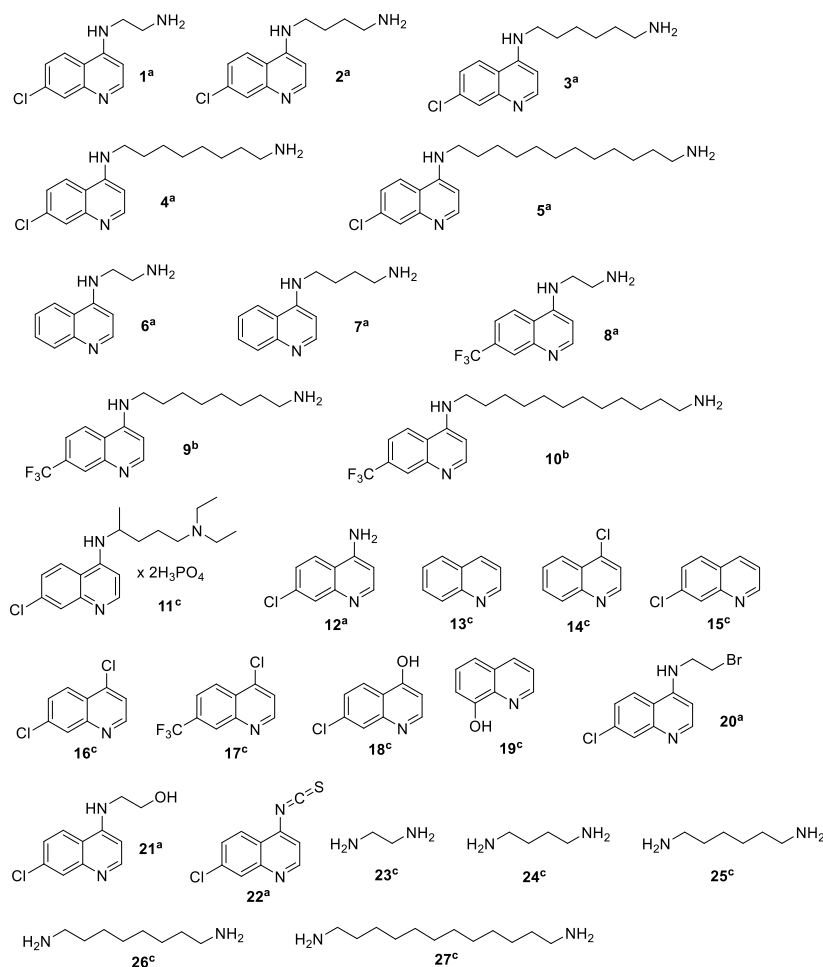
Hinolinski sistem je strukturni fragment koji se nalazi u osnovi autoinducera PQS sistema međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa*, tako da jedinjenja koja su derivati hinolina predstavljaju dobru osnovu za razvijanje novih jedinjenja koja bi inhibitorno delovala na međubakterijsku komunikaciju i proizvodnju faktora virulencije.

4.2.1. Sinteza različitih derivata 4-aminohinolina

Početna biblioteka derivata 4-aminohinolina brojala je ukupno 27 jedinjenja, od kojih je 17 imalo ulogu kontrolnih jedinjenja (Slika 22). Derivati 4-amino hinolina dobijeni su uvođenjem amino grupe ili odgovarajućeg diamina u položaj C(4) hinolinskog sistema koji istovremeno u položaju C(7) sadrži atom vodonika, atom hlora ili CF₃ grupe. Diamino supstituenti se razlikuju po dužini alifatičnog niza. Prvo je ispitivan uticaj dužine alifatičnog niza na anti-virulentni potencijal ove grupe jedinjenja, a zatim i uticaj supstituenta na položaju C(7).

Jedinjenja označena brojevima od **1** do **5** (Slika 21) su derivati sa alifatičnim diaminima različite dužine alkil-niza (C2, C4, C6, C8 i C12), jedinjenja **6** i **7** imaju atom vodonika u položaju C(7) i alifatične diamine (C2 i C4). Jedinjenja **8**, **9** i **10** imaju CF₃ grupu u položaju C(7) hinolinskog jezgra, i alifatične lance C2, C8, odnosno C12. Jedinjenja **9** i **10** su prvi put sintetisana u ovoj studiji. Jedinjenje **11** je hlorokin i sadrži račvast alkil-niz, terminalnu amino-grupu (N'-amino grupa) supstituisanu sa dve etil-grupe i atomom hlora u položaju C(7). Jedinjenje **12** je 4-amino-7-hlorhinolin, dok je jedinjenje **13** nesupstituisani hinolin. Jedinjenja **14-19** i **22** su derivati hinolina sa jednostavnim supstituentima u različitim položajima hinolinskog prstena.

Jedinjenja **20** i **21** sadrže N-etil-grupu koja na kraju sadrži hidroksilnu grupu odnosno atom broma, redom navedeno. Jedinjenja **23** do **27** su diaminoalkani sa različitom dužinom alkil-nizova.



Slika 22. Strukture derivata 4-aminohinolina. A) poznata jedinjenja sintetisana tokom istraživanja, B) nova jedinjenja sintetisana tokom istraživanja, C) jedinjenja iz komercijalnih izvora

4.2.2. Testiranje antibakterijske aktivnosti derivata 4-aminohinolina prema izabranim bakterijskim sojevima

Antibakterijska aktivnost derivata 4-aminohinolina testirana je na sojevima *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens* ATCC 27117 . Sva testirana jedinjenja pokazala su slabu antibakterijsku aktivnost (Tabela 11), sa vrednostima u opsegu od 185 do 5600 μM . MIK vrednosti za nekoliko jedinjenja su bile niže za *S. marcescens*, u odnosu na MIK vrednosti za *P. aeruginosa*, a uočena je i promena MIK vrednosti u zavisnosti od dužine alifatičnog niza (jedinjenja **3**, **4** i **5**).

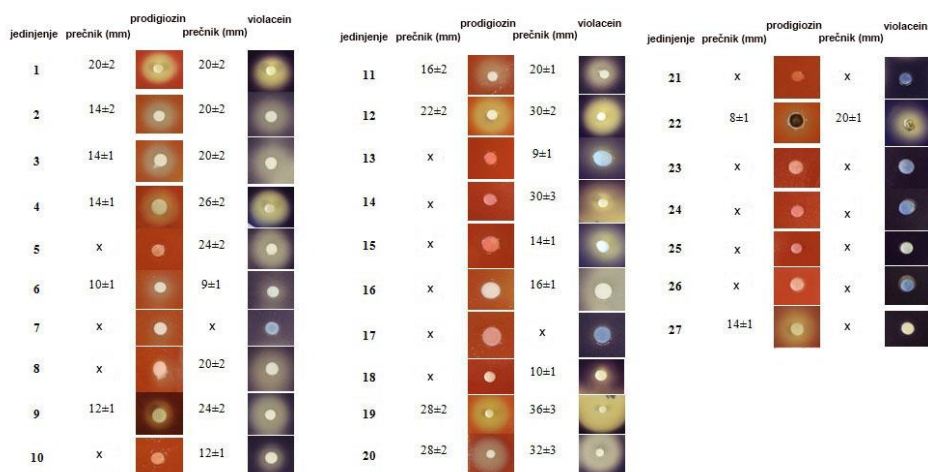
Tabela 11. Minimalne inhibitorne koncentracije derivata 4-aminohinolina za vrste *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens* (μM).

Derivat	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>S. marcescens</i>
1 (AQ2)	565	565
2 (AQ4)	1000	1001
3 (AQ6)	1800	1800
4 (AQ8)	1635	1635
5 (AQ12)	1380	690
6 (DCAQ2)	1335	1335
7 (DCAQ4)	2320	2320
8 (7TFMAQ2)	1960	980
9 (7TFMAQ8)	1475	185
10 (7TFMAQ12)	1265	315
11 (CQDP, hlorokin difosfat)	970	970
12 (JK216)	1400	700
13 (Hinolin)	3870	3870
14 (4-CIQ)	3055	3055
15 (7-CIQ)	3055	765
16 (4,7-DCIQ)	2525	2525
17 (4CI-7TFMQ)	2160	2160
18 (4OH-7CIQ)	2758	1390
19 (8-hydroxyQ)	860	430
20 (AQEtBr)	1750	1750
21 (AQEtOH)	2245	2245
22 (4-NCS-7CQ)	1130	1130
23 (1,2-DAE)	8320	8320
24 (1,4-DAB)	5670	5670
25 (1,6-DAH)	4300	4300
26 (1,8-DAO)	3465	3465
27 (1,12-DADD)	2495	2495

4.2.3. Uticaj derivata 4-aminohinolina na produkciju bakterijskih pigmenta prodigiozina i violaceina

Sinteza crvenog pigmenta prodigiozina kod *S. marcescens*, kao i sinteza ljubičastog pigmenta violaceina kod *Chromobacterium violaceum* su pod kontrolom sistema međubakterijske komunikacije. Kod soja *C. violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997) gen za sintezu *N*-acil homoserin laktona kratkog lanca je mutiran tako da može da sintetiše violacein samo kada se u medijum doda autoinducer. Ukoliko ispitivano jedinjenje narušava sistem međubakterijske komunikacije usled kompeticije sa egzogeno dodatim autoinducerom za odgovarajući receptor (CviR) dolazi do inhibicije proizvodnje violaceina.

Sva sintetisana jedinjenja testirana su na sposobnost inhibicije proizvodnje bakterijskih pigmenta prodigiozina i violaceina. Utvrđeno je da jedinjenja **5** i **10** deluju specifično samo na produkciju violaceina, s tim što je zona inhibicije dvostruko veća za jedinjenje **5**. Jedinjenja **3**, **4** i **9** utiču na produkciju oba pigmenta, ali na osnovu prečnika zone može se reći da imaju veći uticaj na produkciju violaceina (Slika 23). Najveće zone inhibicije proizvodnje violaceina formiraju se u prisustvu jedinjenja **19** i **20**, i to 36 mm, odnosno 32 mm redom navedeno. Veličina zona za prodigiozin za oba jedinjenja iznosi 28mm.



Slika 23. Inhibicija sinteze prodigiozina i violaceina pod uticajem derivata 4-aminohinolina (**1-22**) i diamina (**23-27**). Inhibicija se uočava kao pojava zone prosvetljenja oko diska na koji je naneto jedinjenje i predstavljena je kao srednja vrednost prečnika zone izražena u milimetrima. Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost eksperimenata ± standardna devijacija, a reprezentativni eksperiment je prikazan, Koncentracija u kojoj su jedinjenja testirana iznosila je 250 µg/disku.

4.2.4. Inhibicija formiranja biofilмова derivatima 4-aminohinolina

Većina derivata 4-aminohinolina nisu pokazala sposobnost da inhibiraju formiranje biofilмова kod *S. marcescens* ATCC27117. Inhibicija formiranja biofilмова uočena je samo u prisustvu jedinjenja **5** i **10**, koja su u koncentraciji od 25 µg/ml inhibirala formiranje biofilмова za 52%, odnosno 57%, a pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 50 µg/ml, inhibirali su formiranje biofilмова do 60% (Tabela 12).

Tabela 12. Uticaj derivata 4-aminohinolina na proces formiranja biofilмова kod *S. marcescens* ATCC 27117, izražen u procentima.

Testirana jedinjenja	Koncentracije		
	10 (µg/ml)	25 (µg/ml)	50 (µg/ml)
1 (AQ2)	147±10	135±8	95±10
2 (AQ4)	109±7	107±10	140±12
3 (AQ6)	137±12	137±12	147±10
4 (AQ8)	98±10	98±10	99±10
5 (AQ12)	88±15	48±5	39±5
6 (DCAQ2)	138±12	125±10	134±15
7 (DCAQ4)	128±10	117±8	169±15
8 (7TFMAQ2)	93±10	96±2	90±10
9 (7TFMAQ8)	103±15	70±5	80±10
10 (7TFMAQ12)	110±6	43±2	40±4
11 (CQDP, hlorokin difosfat)	118±10	130±15	144±15
12 (JK216)	155±15	165±8	116±6
13 (Hinolin)	124±15	110±15	110±8
14 (4-ClQ)	100±12	100±15	126±7
15 (7-ClQ)	129±15	136±12	158±20
16 (4,7-DCIQ)	122±12	101±5	170±15
17 (4Cl-7TFMQ)	138±8	133±7	110±10
18 (4OH-7ClQ)	88±10	95±8	99±10
19 (8-hydroxyQ)	125±10	119±10	96±8
20 (AQEtBr)	139±25	159±10	136±15
21 (AQEtOH)	150±10	170±20	132±15
22 (4-NCS-7CQ)	134±10	140±15	139±12
23 (1,2-DAE)	98±12	104±10	108±15
24 (1,4-DAB)	89±12	85±10	94±15
25 (1,6-DAH)	104±6	119±10	139±10
26 (1,8-DAO)	94±10	85±12	112±15
27 (1,12-DADD)	105±10	124±12	141±10

* Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost eksperimenta ± standardna devijacija, a reprezentativni eksperiment je prikazan

Derivati 4-aminohinolna testirani su i na biofilmovima *P. aeruginosa* PAO1, gde su se po aktivnosti izdvojila jedinjenja **5** i **10**. Primenjeni u koncentraciji od 10 µg/ml derivati **5** i **10** su inhibirali formiranje biofilмова za 20% odnosno 17%, a pri koncentraciji od 50 µg/ml inhibicija je iznosila 40%, odnosno 48% (Tabela 13). Jedinjenja **4** inhibirao je formiranje biofilмова za 56% pri koncentraciji od 10 µg/ml, a pri koncentraciji od 50 µg/ml inhibicija je iznosila 62%. U tabeli 12 su prikazane i vrednosti dobijene prilikom testiranja derivata **17** koji je jedan od kontrolnih derivata.

Tabela 13. Uticaj derivata 4-aminohinolna na proces formiranja biofilмова *P. aeruginosa* PAO1.

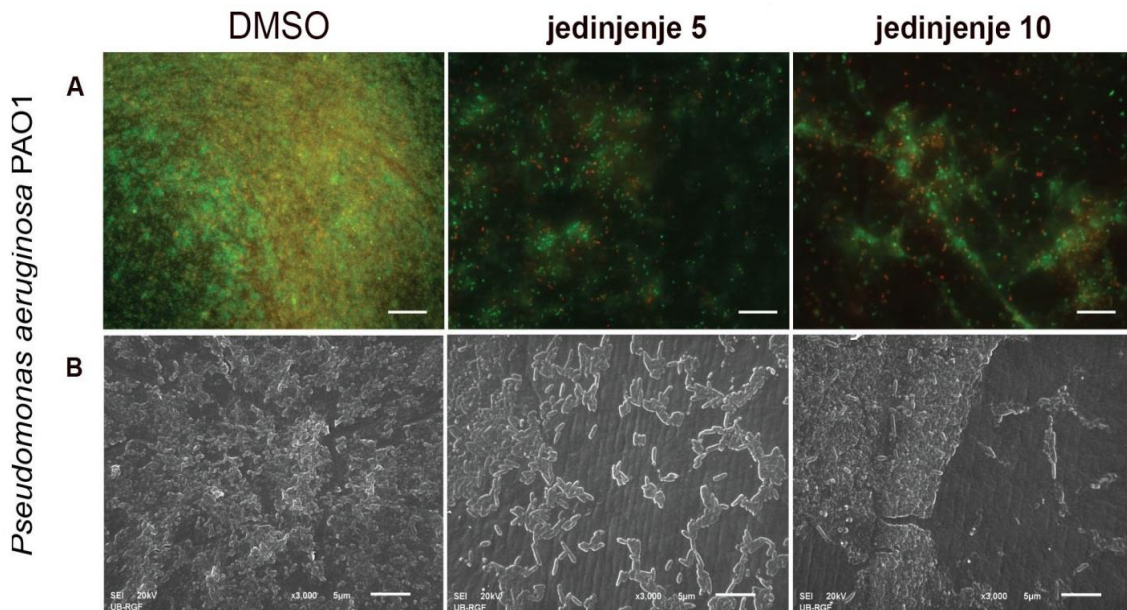
Testirana jedinjenja	Koncentracije		
	10 (µg/ml)	25 (µg/ml)	50 (µg/ml)
4 (AQ8)	44 ± 2	48 ± 5	38 ± 2
5 (AQ12)	79 ± 2	58 ± 7	60 ± 6
10 (7TFMAQ12)	67 ± 3	46 ± 5	52 ± 5
17 (4Cl-7TFMQ)	83 ± 8	82 ± 10	98 ± 10

* Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost eksperimenta ± standardna devijacija, a reprezentativni eksperiment je prikazan

Inhibitorno dejstvo jedinjenja **5** i **10** na formiranje biofilмова *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens* ATCC 27117 testirano je na medicinskim kateterima i na pokrovnim staklima. Biofilmovi formirani na kateterima analizirani su skenirajućom elektronskom mikroskopijom, dok su biofilmovi formirani na pokrovnim staklima proučavani fluorescentnom mikroskopijom. Svi preparati pripremani za fluorescentnu mikroskopiju su obojeni SYTO[®] 9 (zelena) i PI (crvena) fluorescentnim bojama .

Biofilm *P. aeruginosa* PAO1 formiran je na pokrovnom stakliću u prisustvu jedinjenja **5** i **10** ili rastvarača DMSO kao kontrole.

U kontrolnom eksperimentu u prisustvu DMSO formirao se kompaktan biofilm i na preparatu (Slika 24A) se uočavaju žive i mrtve bakterijske ćelije, kao i komponente matriksa biofilma, odnosno eDNK u sastavu matriksa koja je obojena fluorescentnim bojama. U prisustvu jedinjenja **5** ili **10** u BFIC₅₀ koncentracijama na pokrovnim staklima se uočava značajno manja količina biofilma, kao i veći broj živih ćelija u odnosu na mrtve (Slika 24A).

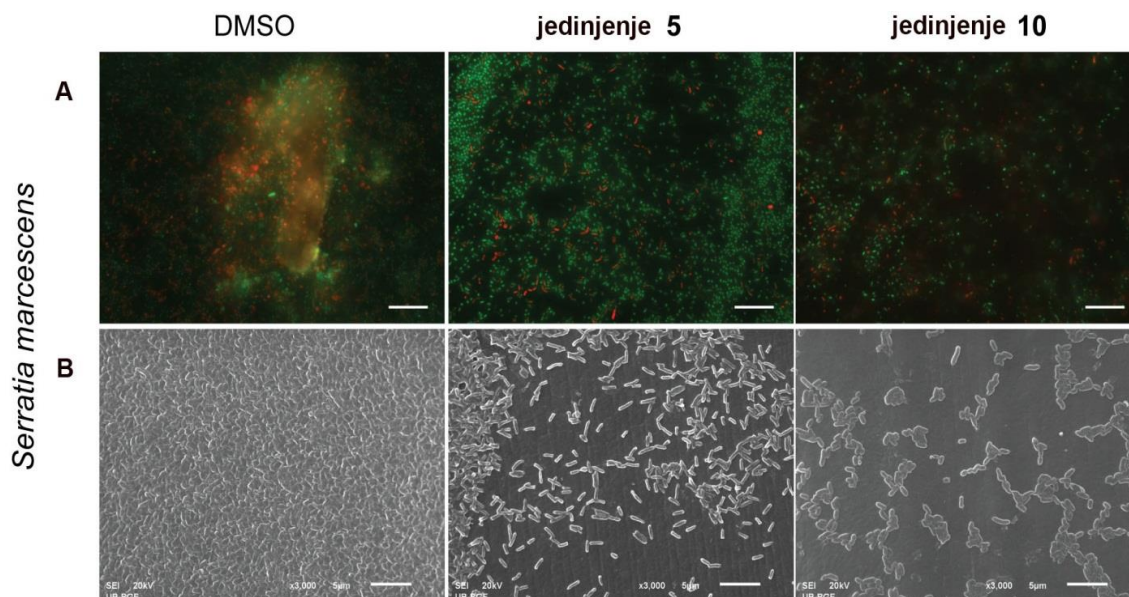


Slika 24. Inhibicija formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1 u prisustvu jedinjenja **5** ili **10** u $BFIC_{50}$ koncentraciji. (A) Fluorescentna mikrografija biofilma *P. aeruginosa* PAO1 na pokrovnom staklu. (B) Skenirajuća elektronska mikrografija biofilma *P. aeruginosa* PAO1 na medicinskom kateteru. Biofilmovi predstavljani na mikrografijama A su obojeni fluorescentnim bojama SYTO[®]9 (zeleni) i PI (crveni). Razmernik na mikrografijama dobijenim fluorescentnim mikroskopom predstavlja 10 μ m, a skenirajućom elektronskom mikroskopijom 5 μ m.

Medicinski kateteri na kojima je formiran biofilm *P. aeruginosa* PAO1 u prisustvu jedinjenja **5**, **10** ili DMSO kao kontrolom, snimljeni su skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Na kontrolnoj mikrografiji (Slika 24B) uočava se biofilm formiran na medicinskom kateteru u formi kompaktne višeslojne strukture koju grade gusto zbijene bakterijske ćelije. U prisustvu jedinjenja **5** ili **10** (Slika 24B) uočava se odsustvo kompaktne strukture biofilma, i bakterije su raspoređene samo u jednom sloju.

Mikroskopskim metodama utvrđen je i efekat derivata **5** i **10** na biofilm *S. marcescens* ATCC 27117. Biofilm *S. marcescens* formiran je na pokrovnom staklu u prisustvu jedinjenja **5** i **10** ili rastvarača DMSO kao kontrolom. Na kontrolnoj mikrografiji (Slika 25A) vidi se formiran kompaktan biofilm sa živim i mrtvim bakterijskim ćelijama i matriksom biofilma.

Jedinjenje **5** u $BFIC_{50}$ koncentraciji vidno inhibira formiranje biofilma, te se na mikrografiji (Slika 25A) može videti da dominiraju žive ćelije u odnosu na mrtve kojih ima u malom broju i difuzno su raspoređene. Na preparatu (Slika 25A) biofilma formiranog u prisustvu jedinjenja **10** uočljive su samo pojedinačne ćelije žive odnosno mrtve u malom broju.



Slika 25. Inhibicija formiranja biofilma *S. marcescens* u prisustvu jedinjenja **5** ili **10** u BFIC₅₀ koncentraciji . (A) Fluorescentna mikrografija biofilma *S. marcescens* na pokrovnom staklu (B) Skenirajuća elektronska mikrografija biofilma *S. marcescens* na medicinskom kateteru. Biofilmovi predstavljeni na mikrografijama A su obojeni fluorescentnim bojama SYTO[®]9 (zeleni) i PI (crveni). Razmernik na mikrografijama dobijenim fluorescentnim mikroskopom predstavlja 10 μm, a skenirajućom elektronskom mikroskopijom 5 μm.

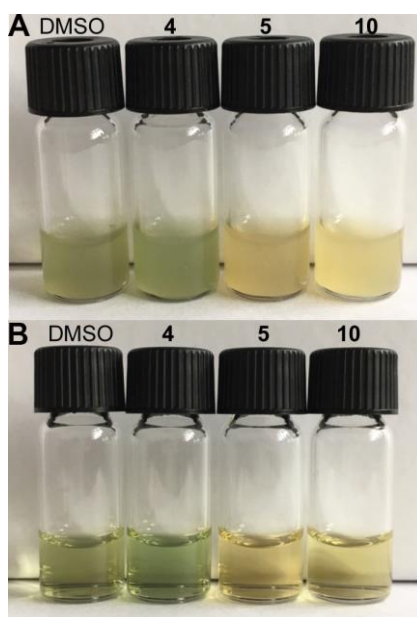
Mikrografije na slici 25B prikazuju biofilm *S. marcescens* formiran na medicinskom kateteru. U kontrolnom uzorku struktura formiranog biofilma je kompaktna, uočava se masa gusto zbijenih ćelija. U prisustvu jedinjenja **5** na preparatu se vidi odsustvo kompaktnog biofilma, odnosno uočavaju se samo pojedinačne ćelije rasute po površini medicinskog katetera.

Ćelije po obodu preparata su gusto zbijene, što predstavlja malu količinu biofilma koji je uspeo da se formira u prisustvu jedinjenja **5**. Na poslednjoj mikrografiji slike 25B koja prikazuje efekat jedinjenja **10** na proces formiranja biofilma uočavaju se grupacije od po desetak ćelija difuzno raspoređenih po preparatu i mali broj pojedinačnih ćelija.

4.2.5. Uticaj derivata 4-aminohinolina na produkciju piocijanina

Piocijanin je zeleni pigment koga proizvodi *P. aeruginosa* i važan je virulentni faktor ove vrste. Uticaj derivata 4-aminohinolina na produkciju ovog pigmenta merena je kvantifikacijom sinteze pigmenta kod soja *P. aeruginosa* PA14 (Slika 26).

Jedinjenje **5** inhibiralo je produkciju piocijanina za 50% pri koncentraciji od 50 µg/ml, dok je jedinjenje **10** pokazalo značajno veću aktivnost i inhibiralo proizvodnju ovog pigmenta za 90% pri istoj koncentraciji. Jedinjenje **4** nije imalo efekta na produkciju piocijanina.



Slika 26. Inhibicija produkcije piocijanina kod *P. aeruginosa* PA14 nakon 24 sata inkubacije sa jedinjenjima u koncentraciji od 50 µg/ml. Na slici su prikazane (A) pune kulture nakon inkubacije i (B) njihovi supernatanti.

4.2.6. Uticaj derivata 4-aminohinolina na proizvodnju autoinducera signalnih puteva međubakterijske komunikacije vrste *P. aeruginosa*

Ekspresija gena odgovornih za ispoljavanje različitih virulentnih karakteristika vrste *P. aeruginosa* regulisana je sistemom međubakterijske komunikacije. Uticaj jedinjenja na signalne puteve *P. aeruginosa* analizirana je praćenjem nivoa proizvodnje autoinducera u prisustvu jedinjenja **4**, **5** ili **10**.

Kvantifikacija proizvedenih autoinducera rađena u testovima sa biosenzorskim sojevima specifičnim za svaki signalni put međubakterijske komunikacije i to *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-rhlA za merenje C4-HSL, *P. aeruginosa* PA14-R3 za merenje 3-oxo-C12 HSL i *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA za kvantifikaciju PQS/HHQ. Kao negativna kontrola korišćen je neaktivni derivat **17** (Tabela 14).

Tabela 14. Uticaj derivata 4-aminohinolina (50 μ g/ml) na signalne puteve međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa*.

Kvantifikacija produkovanih autoinducera kod <i>P. aeruginosa</i> PAO1			
Testirana jedinjenja	Autoinduceri signalnih puteva		
	3oxoC12-HSL (PA14-R3)	C4-HSL (PAO1 Δ rhl)	PQS/HHQ (PAO1 Δ pqsA)
4 (AQ8)	55 \pm 6	77 \pm 5	91 \pm 8
5 (AQ12)	316 \pm 16	91 \pm 15	16 \pm 2
10 (7TFMAQ12)	118 \pm 10	80 \pm 12	26 \pm 4
17 (4Cl-7TFMQ)	148 \pm 12	86 \pm 9	69 \pm 3

* Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost eksperimenta \pm standardna devijacija, a reprezentativni eksperiment je prikazan

Jedinjenje **4** smanjilo je proizvodnju 3oxoC12-HSL za 45% ukazujući na njegovo inhibitorno dejstvo na Las signalni put. Jedinjenja **5** i **10** inhibirala su proizvodnju autoinducera PQS signalnog puta (PQS i HHQ) za 85% odnosno 75%, ali su stimulisala Las signalni put. Ni jedno od testiranih jedinjenja nije pokazalo značajan uticaj na Rhl signalni put. Kontrolno jedinjenje **17** inhibiralo je proizvodnju autoinducera PQS signalnog puta za 30%. Ovi rezultati pokazuju da jedinjenja **5** i **10** utiču na smanjenje formiranja biofilma kao i proizvodnju piocijanina putem inhibicije PQS signalnog puta.

4.2.7. Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti, modelovanje inhibicije formiranja biofilma kod *S. marcescens*

Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti derivata 4-aminohinolina, kao i modelovanje formiranja biofilmova *S. marcescens* rađene su za najaktivnija jedinjenja **5** i **10** (7-Cl i 7-CF₃ substituenti sa C12 alkil-nizom) u cilju otkrivanja mehanizma njihovog dejstva. Većina derivata 4-aminohinolina pokazuju jaku retenciju na C18 stacionarnoj fazi sa mobilnom fazom od pH \geq 5. U slučaju kad je mobilna faza od pH \leq 1 retencija je bila znatno slabija.

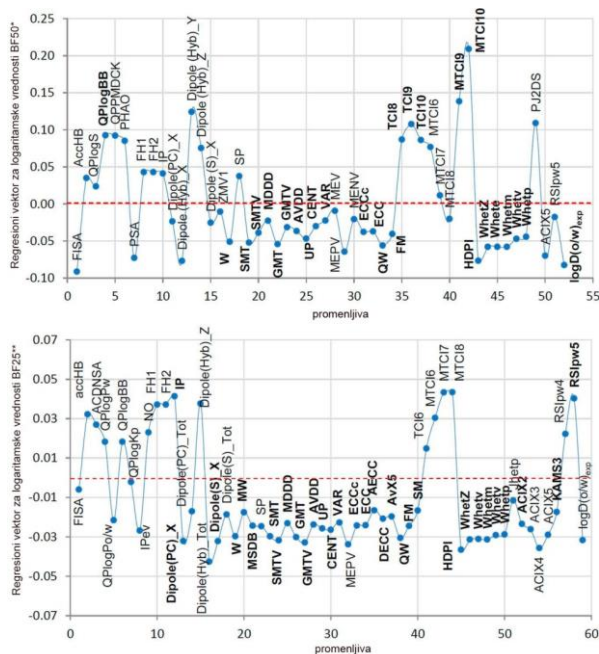
Particioni koeficijent, utvrđen u ovoj studiji za testirane derivate $\log D(o/w)_{\text{exp}}$, kao i čitav set od 180 molekularnih opisa korišćeni su kao nezavisne varijable, a logaritamske vrednosti aktivnosti testiranih jedinjenja u više koncentracija na formiranje biofilmova *S. marcescens* su korišćene kao zavisne varijable (Tabela 15).

Tabela 15. RM vrednosti (parameter lipofilnosti) standarda (Andric *et al.*, 2016)

Referentna jedinjenja	LogP	RM	Jedinjenja	RM	$\log D(o/w)_{\text{exp}}$
4-Aminofenol	0.04	-1.06	1 (AQ2)	-0.50	1.03
p-Anisidin	0.95	-0.60	2 (AQ4)	-0.41	1.22
Difenilamin	3.50	0.50	3 (AQ6)	-0.31	1.43
Fenol	1.46	-0.10	4 (AQ8)	-0.12	1.81
4-Nitrofenol	1.91	0.03	5 (AQ12)	0.37	2.81
3-Nitrofenol	2.00	0.10	6 (DCAQ2)	-0.79	0.45
Benzil alcohol	1.10	-0.07	7 (DCAQ4)	-0.66	0.71
2-Naftol	2.70	0.35	8 (7TFMAQ2)	-0.43	1.17
Naftilamin	2.25	-0.31	9 (7TFMAQ8)	-0.07	1.19
2,4-Dihlorfenol	3.06	0.43	10 (7TFMAQ12)	0.43	2.94
Antracen	4.45	1.28	11 (CQDP hlorokin difosfat)	-0.16	1.73
4-Hlorofenol	2.39	0.23	12 (JK216)	-0.21	1.17
Acetofenon	1.58	0.18	13 (Hinolin)	-0.43	1.62
Piren	4.88	1.69	14 (4-ClQ)	-0.27	1.51
Fluoren	4.18	1.19	15 (7-ClQ)	-0.31	1.43
Acenaften	3.92	1.06	16 (4,7-DCIQ)	-0.07	1.91
Fenantren	4.46	1.19	17 (4Cl-7TFMQ)	0.25	2.57
Simazin	2.18	-0.03	18 (4OH-7ClQ)	-0.14	1.77
4-Bromoanilamin	2.26	-0.37	19 (8-hydroxyQ)	-0.45	1.13
Benzofenon	3.18	0.69	20 (AQEtBr)	-0.12	1.81
2-Aminofenol	0.62	-0.69	21 (AQEtOH)	-0.31	1.43
Bromazepam	2.05	-0.33	22 (4-NCS-7CQ)		1.70
Diazepam	2.82	-0.14			
4-Metoksifenol	1.58	-0.12			
Benzoantracen	5.76	1.69			

Nakon prvog testiranja broj nezavisnih varijabla je smanjen na 52-29 da bi se prediktivne performanse značajno uvećale. Analizom dobijenih vrednosti molekularnih opisa ustanovljeno je da veličina i grananje molekula značajno doprinose aktivnosti jedinjenja.

Negativne vrednosti regresionog vektora ukazuju na to da derivati dugog lanca bez grananja imaju veću aktivnost na međubakterijsku komunikaciju (Slika 27). Derivati **5** i **10** imaju nešto veće vrednosti Vinerovog indeksa (indeks sume dužine najkraćih delova, odnosno grana molekula) u poređenju sa ostalim testiranim derivatima. Ova jedinjenja su najaktivniji inhibitori formiranja biofilmova čak i u poređenju sa jedinjenjima **4** i **9** kojima su strukturno najbližnji.



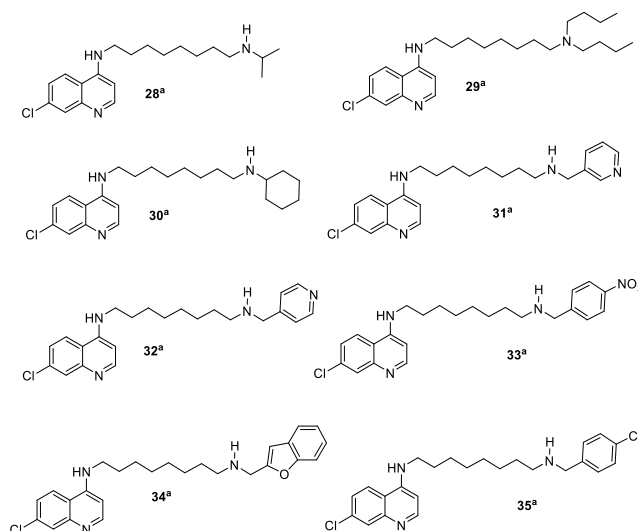
Slika 27. Regresioni koeficijenti dobijeni analizom veze strukture i aktivnosti na logaritamskim vrednostima inhibicije formiranja biofilm u koncentracijama 25 i 50. Varijable sa vrednostima >1 su podebljane na slici

Lipofilnost molekula $\log D(o/w)_{\text{exp}}$, takođe jedna od značajnih molekularnih karakteristika jedinjenja, doprinosi aktivnosti jedinjenja. Povećanje lipofilnosti derivata dovodi do povećanja anti-biofilm potencijala jedinjenja. Na grafiku logaritamske vrednosti BF50 lipofilnost je u negativnim vrednostima. Derivati sa jakom silom privlačenja elektrona, CF_3 grupom na C(7) poziciji, su lipofilniji u poređenju sa 7-hlor derivatima. Derivat **10** ima najvišu vrednost lipofilnosti, dok derivat **6** najnižu.

4.3. Optimizacija strukture 4-amino-7-hlor-hinolina dugog lanca u cilju povećanja anti-virulentnog efekta, N^2 -supstituisanih derivati 4-amino-7-hlor-hinolina

Na osnovu rezultata koji su pokazali da jedinjenje **4** (AQ8) tj. C8 aminohinolin inhibira formiranje biofilmova i smanjuje produkciju 3-oxo-C12-HSL, ali da stimuliše proizvodnju piocijanina i ne pokazuje uticaj na količinu proizvedenih PQS i HHQ autoinducera, struktura AQ8 jedinjenja je modifikovana sa ciljem da se ispita uticaj supstituenta na terminalnoj amino-grupi na inhibiciju PQS signalnog puta i mogućnost povećanja anti-virulentne aktivnosti ove grupe jedinjenja.

Da bi se ispitaio uticaj karaktera supstituenta (alkil ili acil supstituenti), sterni zahtevi (različite alkil grupe) i elektronska gustina terminalne *N'*-benzil grupe na ekspresiju različitih faktora virulencije kod *P. aeruginosa* PAO1 dizajnirana je i sintetisana serija *N'*-supstituisanih derivata AQ8 jedinjenja (Slika 28).



Slika 28. Strukture *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina, novih derivata sintetisanih kao dodatak biblioteci hinolinskih derivata dizajniranih za potrebe ovog rada. Jedinjenja **28**, **29** i **30** su *N'*-alkil ili *N'*-cikloalkil derivati, a jedinjenja od **31** do **35** su derivati hinolina sa različitim *N'*-supstituentima.

4.3.1. Ispitivanje anti-virulentnog potencijala *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na *P. aeruginosa* PAO1

Da bi se proverio anti-virulentni potencijal derivata prvo je testirana njihov efekat na rast soja *P. aeruginosa* PAO1. Ni jedno jedinjenje nije pokazalo značajnu antibakterijsku aktivnost, sa MIK vrednostima od 2-4 mM.

S obzirom na značaj piocijanina u procesu patogeneze *P. aeruginosa* prvo je ispitan uticaj *N'*-supstituisanih derivata na proizvodnju ovog pigmenta. Većina derivata je pokazala značajno povećanje inhibitorne aktivnosti na proizvodnju piocijanina u poređenju sa početnim jedinjenjem **4** (AQ8), pri čemu su se kao najaktivniji izdvojili derivati **33** i **34**, sa inhibitornim dejstvom od 89% i 88% pri koncentraciji od 50 µg/ml. Samo se jedinjenje **28** pokazalo kao neaktivno (Tabela 16).

Tabela 16. Uticaj derivata (50 µg/ml) na sintezu piocijanina vrste *P. aeruginosa* PA14.

Testirano jedinjenje	Piocijanin (%)
4	112±5
28	94±6
29	35±7
30	75±8
31	55±10
32	30±5
33	11±4
34	12±4
35	22±5

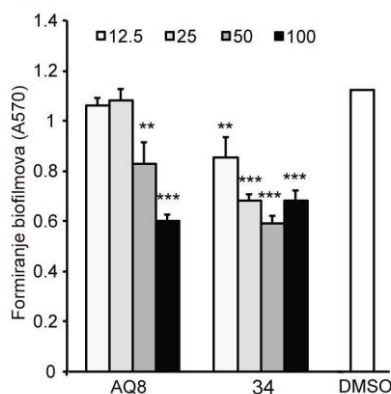
* Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost eksperimenta ± standardna devijacija, a reprezentativni eksperiment je prikazan

Uticaj *N'*-supstituisanih derivata AQ8 na formiranje biofilmova kod *P. aeruginosa* PAO1 testiran je u opsegu koncentracija od 12.5 µg/ml do 100 µg/ml i određene su BFIC₅₀. Od osam testiranih derivata aktivnost su pokazala tri jedinjenja – derivati **33**, **34** i **35**, čije su BFIC₅₀ vrednost iznosile 50 µM. Jedinjenja **28** i **31** pokazala su slabu sposobnost inhibicije biofilmova, dok su ostali derivati bili neaktivni (Tabela 17).

Tabela 17. Inhibitorne vrednosti *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na proces formiranja biofilmova kod *P. aeruginosa* PAO1.

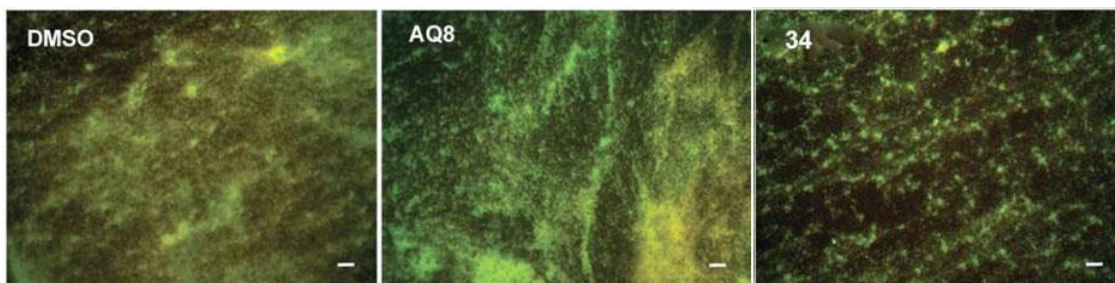
Testirano jedinjenje	BFIC ₅₀ (µM)
4	100
28	125
29	neaktivan
30	neaktivan
31	125
32	neaktivan
33	50
34	50
35	50

Za dalje analize izabrano je jedinjenje **34** koje je pokazalo dozno-zavisnu inhibiciju formiranja biofilmova kod *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 29).



Slika 29. Uticaj jedinjenja **34** i polaznog jedinjenja **4** (AQ8) na formiranje biofilмова *P. aeruginosa* PAO1. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$

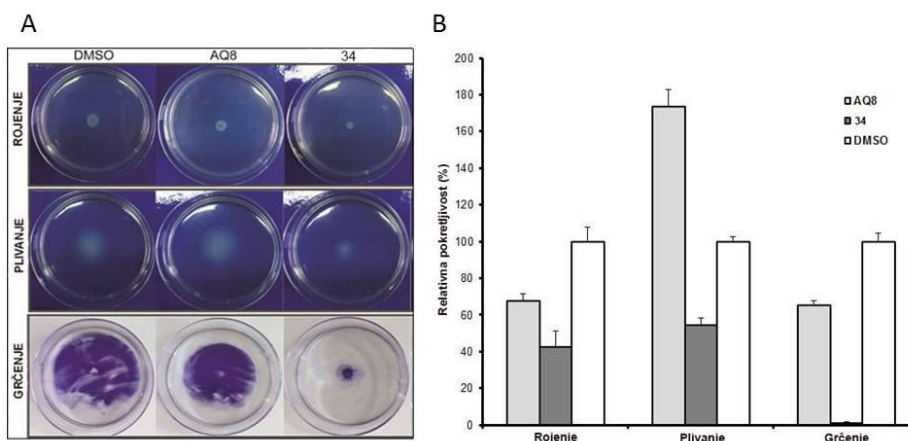
Efekat jedinjenja **34** i **4** (AQ8) na formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 na pokrovnim staklima praćen je fluorescentnom mikroskopijom. Na kontrolnom preparatu, kao i preparatu koji je tretiran jedinjenjem **4** (AQ8) uočavaju se biofilmovi slične strukture (Slika 30). Međutim, jedinjenje **34** inhibiralo je formiranje biofilмова tako da se na preparatu uočavaju male grupe živih ćelija i značajno manja količina matriksa biofilma (Slika 30).



Slika 30. Fluorescentna mikrografija biofilмова *P. aeruginosa* PAO1 formiranih u prisustvu jedinjenja **4** (AQ8) i **34** u $BFIC_{50}$ koncentraciji. Biofilmovi su obojeni fluorescentnim bojama SYTO[®] 9 (zelena) i PI (crvena). Razmernik predstavlja 10 μm .

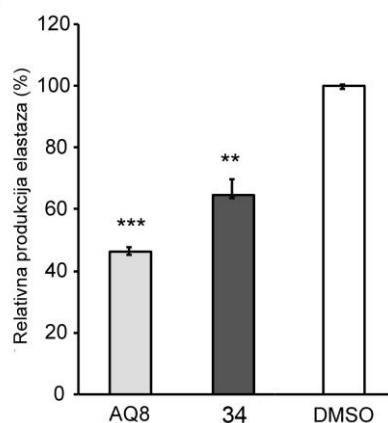
Efekat jedinjenja **34** na pokretljivost *P. aeruginosa* PAO1 upoređena je sa aktivnošću početnog jedinjenja **4** (AQ8). Jedinjenje **34** pokazalo je najveći uticaj na grčenje (Slika 31A), koje je inhibirano preko 95% u koncentraciji od 50 μM (Slika 31B), dok je u istoj koncentraciji ovo jedinjenje inhibiralo plivanje i rojenje za oko 50% (Slika 31 B).

Jedinjenje **4** (AQ8) pokazalo je manju inhibitornu aktivnost na pokretljivost tipa rojenja i grčenja u odnosu na njegov derivat **34**, dok je stimulatorno delovalo na plivanje. Vrednosti u procentima su dobijene merenjem veličine prečnika zone pokretljivosti *P. aeruginosa* PAO1 u prisustvu jedinjenja.



Slika 31. Efekat jedinjenja **34** i **4** (AQ8) na pokretljivost *P. aeruginosa* PAO1 pri koncentracijama od 50 μ M. (A) Izgled Petrijevih šolja na kojima je ispitivan uticaj jedinjenja na pokretljivost, (B) Grafički prikaz uticaja jedinjenja na pokretljivost, kvantifikovan i izražen u procentima. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija.

Elastaze su enzimi koji degraduju elastin, kolagen, fibrin i interaguju sa komponentama imunološkog sistema domaćina, čime inaktivišu imunoglobuline (Wretlind i Pavlovskis, 1983) i predstavljaju važan virulentan faktor ovog patogenog soja. Polazno jedinjenje **4** (AQ8) pokazalo je veću inhibitornu aktivnost prema proizvodnji elastaze kod *P. aeruginosa* PAO1 nego njegov derivat, jedinjenje **34**. U prisutvu jedinjenja **4** (AQ8) u koncentraciji od 50 μ M produkcija elastaza je smanjena za 50%, dok je jedinjenje **34** u istoj koncentraciji smanjilo produkciju elastaze za 35% (Slika 32).



Slika 32. Efekat jedinjenja **34** i **4** (AQ8) na produkciju elastaze kod *P. aeruginosa* PAO1. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

4.3.1.1. Uticaj *N*'-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na signalne puteve međubakterijske komunikacije vrste *P. aeruginosa* u eseju kompeticije za receptor

Inhibiranje međubakterijske komunikacije može se ostvariti na više načina, a jedan od najefikasnijih je vezivanje za receptor autoinducera čime se utiče na regulaciju ekspresije različitih virulentnih gena. Za svih sedam derivata i početno jedinjenje **4** (AQ8) ispitivana je sposobnost kompetitivnog vezivanja za receptore tri signalna puta – LasR, RhlR i PqsR, u prisustvu njihovih prirodnih autoinducera 3-oxo-C12 HSL, C4-HSL i HHQ.

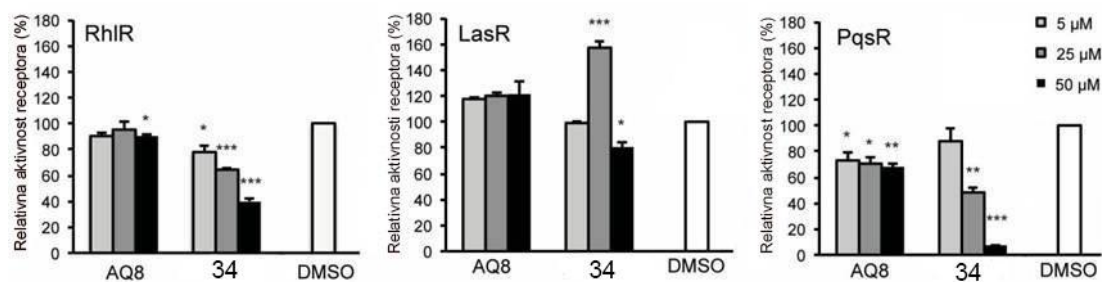
Sva jedinjenja, pri koncentraciji od 50 μ M, su pokazala sposobnost vezivanja za PqsR, inhibirajući njegovu aktivnost od 22% do 93% u odnosu na kontrolu gajenu u prisustvu DMSO (Tabela 18). Najveću inhibitornu aktivnost prema PqsR pokazalo je jedinjenje **34**. Ovaj derivat je pokazao i inhibitornu aktivnost prema RhlR receptoru smanjujući njegovu aktivnost za 93%, dok aktivnost LasR receptora umanjuje za samo 20%. I ostali derivati pokazali su umerenu inhibitornu aktivnost prema RhlR receptoru smanjujući mu aktivnost od 30% do 50%. Ni jedan od derivata nije pokazao sposobnost da smanji aktivnost LasR. Polazno jedinjenje pokazalo je malu sposobnost da inhibira aktivnost PqsR receptora (do 20%), dok na aktivnost ostala dve receptora nije pokazalo značajan uticaj.

Tabela 18. Uticaj derivata *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina (50 μ M) na receptore signalnih puteva međubakterijske komunikacije vrste *P. aeruginosa* izražen u procentima.

Testirano jedinjenje	Aktivacija receptora signalnih puteva međubakterijske komunikacije <i>P. aeruginosa</i> PAO1 receptori signalnih puteva		
	LasR	RhlR	PqsR
4	55 \pm 6	77 \pm 5	91 \pm 8
28	112 \pm 1	76 \pm 5	54 \pm 4
29	117 \pm 4	67 \pm 2	54 \pm 2
30	103 \pm 8	74 \pm 1	78 \pm 1
31	100 \pm 1	70 \pm 3	62 \pm 1
32	98 \pm 1	71 \pm 0.5	60 \pm 2
33	100 \pm 3	52 \pm 4	25 \pm 1
34	80 \pm 4	40 \pm 2	7 \pm 0.5
35	79 \pm 3	53 \pm 5	19 \pm 1

* Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost eksperimenta \pm standardna devijacija, a reprezentativni eksperiment je prikazan

Jedinjenja **34** pokazalo je dozno-zavisan efekat na PqsR receptor (Slika 33) što je ukazalo da je njegov mehanizam delovanja putem kompetitivne inhibicije receptora.



Slika 33. Uticaj jedinjenja **34** i **4** (AQ8) na signalne puteve međubakterijske komunikacije kod vrste *P. aeruginosa*. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$

4.3.1.2. Uticaj *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na produkciju autoinducera signalnih puteva međubakterijske komunikacije vrste *P. aeruginosa*

Da bi se isključila mogućnost da isitivana jedinjenja utiču na bioluminescenciju biosenzora koja je mera aktivnosti ovih jedinjenja, testiran je i uticaj jedinjenja na proizvodnju autoinducera kod *P. aeruginosa* PAO1. Nakon kultivacije *P. aeruginosa* PAO1 u prisustvu derivata **34** i **4** (AQ8) u koncentraciji od 50 μ M, kvantifikovana je količina proizvedenih autoinducera u supernatantima.

Jedinjenje **34** u koncentraciji od 50 μ M inhibiralo je proizvodnju PQS/HHQ za 61% i stimulisalo proizvodnju 3oxoC12-HSL do 191%. Polazno jedinjenje **4** stimulisalo je proizvodnju PQS/HHQ do 171%, a inhibiralo proizvodnju 3-oxo-C12-HSL za 25% (Tabela 19). Ovi rezultati pokazuju da je primarna meta aktivnosti derivata **34** PQS signalni put.

Tabela 19. Uticaj derivata *N*-oktanamino-4-aminohinolina na produkciju autoinducera međubakterijske komunikacije kod vrste *P. aeruginosa*. Vrednosti su predstavljene \pm SD.

Testirano jedinjenje	Proizvodnja autoinducera u prisustvu testiranih jedinjenja (%)		
	Autoinduceri signalnih puteva		
	3oxoC12-HSL	C4-HSL	PQS/HHQ
4	74 \pm 10	87 \pm 1	170 \pm 9
34	191 \pm 17	89 \pm 3	39 \pm 2

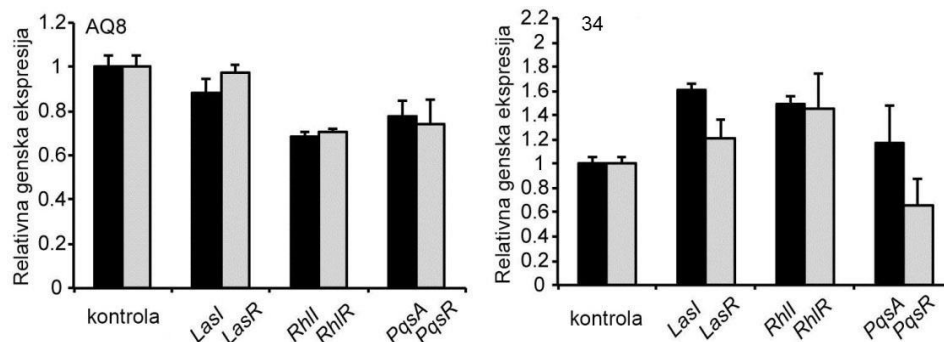
* Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost eksperimenta \pm standardna devijacija, a reprezentativni eksperiment je prikazan

4.3.1.3. Uticaj *N*'-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor hinolina na ekspresiju gena uključenih u međubakterijsku komunikaciju

Analiza ekspresije gena zaduženih za koordinaciju Las, Rhl i PQS sistema međubakterijske komunikacije kod soja *P. aeruginosa* PAO1 ispitivana je u prisustvu jedinjenja **4** (AQ8) i **34**.

Jedinjenje **34** uticalo je na povećanje ekspresije gena lasR za 60%. U prisustvu jedinjenja **4** (AQ8) ekspresija gena rhlA i rhlR smanjena je za približno 50%, dok je jedinjenje **34** delovalo povećanjem nivoa ekspresije za 50%. Dok kod gena pqsA i pqsR nisu uočene značajne promene u ekspresiji pod uticajem jedinjenja **4** (AQ8), a jedinjenje **34** je smanjilo njihovu ekspresiju za 30% (Slika 34).

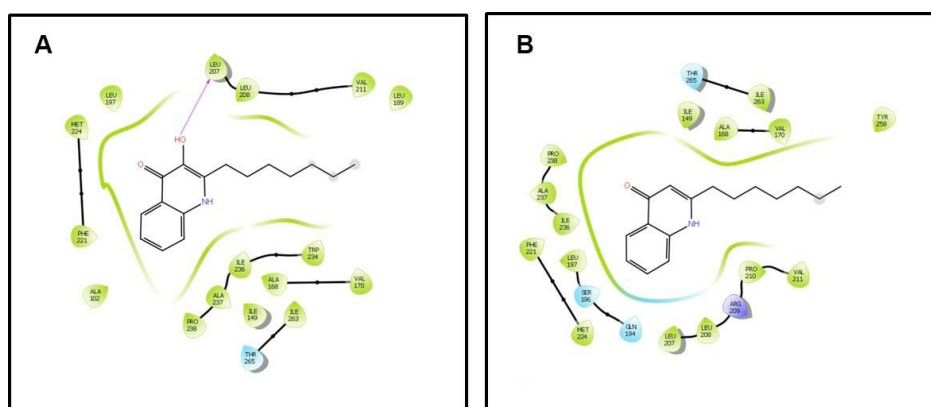
Kako se značajnom promenom u genskoj ekspresiji smatra tek dvostruka razlika u odnosu na kontrolu, može se zaključiti da testirana jedinjenja nemaju uticaja na ekspresiju gena uključenih u proces međubakterijske komunikacije.



Slika 34. Analiza ekspresije gena koji kodiraju sintaze i receptore odgovarajućih signalnih puteva međubakterijske komunikacije kod soja *P. aeruginosa* PAO1 gajenog u prisustvu jedinjenja **4** (AQ8) ili derivata **34** u koncentraciji od 50 μ M. Rezultati genske ekspresije su izraženi u formi relativne ekspresije u odnosu na vrednosti dobijene pri inkubaciji soja *P. aeruginosa* PAO1 u prisustvu DMSO. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija.

4.3.2. Predviđanje orijentacije vezivanja jedinjenja **4** (AQ8) i **34** za PqsR receptor

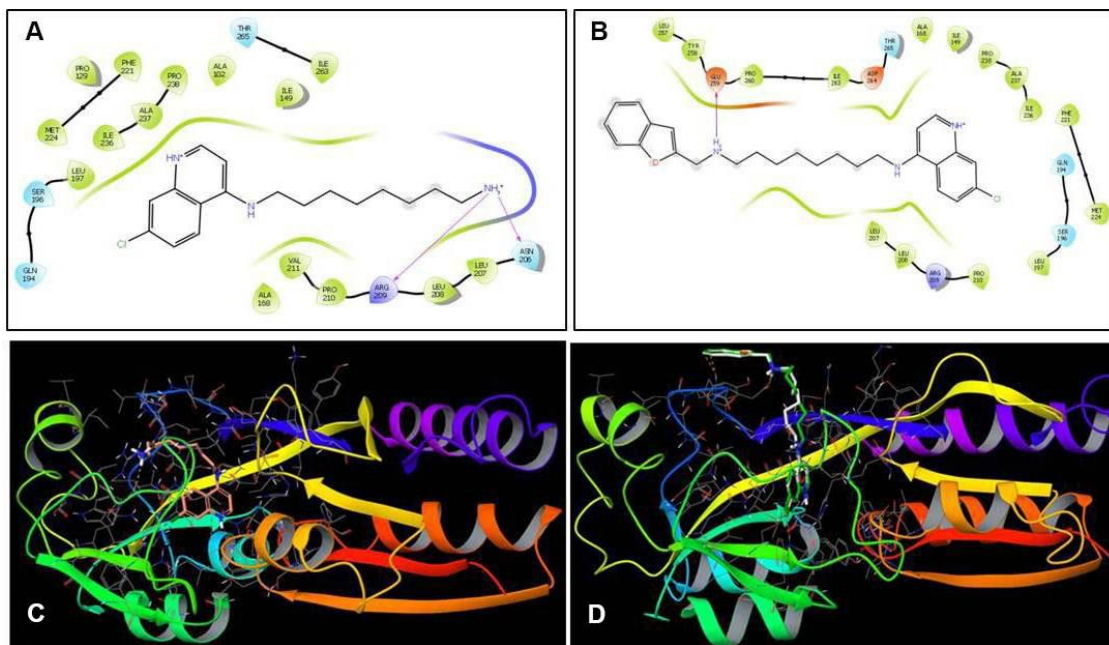
Model simulacije vezivanja jedinjenja za receptor, za početno jedinjenje **4** (AQ8) i njegov najaktivniji derivat **34** napravljen je radi pojašnjenja mehanizma delovanja ovih jedinjenja na PQS signalni put međubakterijske komunikacije. Nativni autoinduceri PQS signalnog puta, PQS i HHQ se sa velikim afinitetom vezuju za receptor PqsR, što je prikazano šematskim putem dijagramom ligand interakcija (Slika 35).



Slika 35. Dijagram interakcija nativnih autoinducera PQS (A) i HHQ (B) sa PqsR receptorom.

Hinolinski prstenovi jedinjenja **34** i **4** (AQ8) vezuju se za isti hidrofobni deo receptora. Hinolinsko jezgro jedinjenja **4** (AQ8) ostvaruje NH- π interakcije sa fenilalaninom (Phe221) i dve halogene interakcije sa bočnim lancem serina (Ser196) i glavnim lancem leucina (Leu197).

Alkilni lanac jedinjenja **4** (AQ8) je postavljen u hidrofilni „džep” formiran od ostataka sporednih lanaca leucina, valina i isoleucina (Leu207, Val211 i Ile236). Terminalna protonovana amino grupa formira jaku vodoničnu vezu sa glavnim lancem karbonilne grupe asparagina i arginina (Asn206 i Arg209) (Slika 36 A i C).



Slika 36. Dijagrami interakcije jedinjenja **4** (AQ8) (A i C), i derivata **34** (B i D) sa PqsR receptorom. Na slici C jedinjenje je šematski predstavljeno belim ugljenicima, a na slici D jedinjenje šematski predstavljeno narandžastim ugljenicima.

Sporedni lanci derivata **34** su postavljeni na suprotnoj strani u poređenju sa polaznim jedinjenjem **4** (AQ8) zbog steričnog položaja terminalnog *N*-substituenta koji je dodatno stabilizovan hidrofobnim interakcijama bočnih lanaca leucina i izoleucina (Leu207 i Ile263). Benzofuran jedinjenja **34** je pozicioniran izvan strukture receptora, gde interaguje sa sporednim lancima glutamina, tirozina, prolina, asparagine i lizina (Glu151, Glu259, Tyr165, Tyr206, Tyr258, Tyr268, Pro260, Asp264 i Lys266) (Slika 36 B i D).

4.3.3. Ispitivanje anti-virulentnog potencijala *N*'-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na *S. marcescens* ATCC 27117

Jedinjenja 28 do 33 nemaju antibakterijsku aktivnost prema *S. marcescens* jer su njihove MIK vrednosti jednake ili veće od 4 mM.

Prodigiozin je crveni pigment koga sintetiše *S. marcescens* pod kontrolom sistema međubakterijske komunikacije. Uticaj *N'*-supstituisanih derivata na međubakterijsku komunikaciju kod *S. marcescens* praćen je merenjem produkcije ovog pigmenta u njihovom prisustvu. Jedinjenje **4** (AQ8) izazvalo je pojavu zone inhibicije proizvodnje ovog pigmenta prečnika 14 mm, a zone slične dimenzije pojavile su se i aktivnošću jedinjenja **28** i **31** (Tabela 20). Aktivnosti ostalih derivata nisu bile značajne.

Tabela 20. Uticaj derivata *N'*-supstituisanih 4-amino-7-hlor-hinolinima na sintezu prodigiozina, testiran u koncentraciji od 200 µg/disk.

Testirano jedinjenje	Prečnik zone inhibicije (mm)
4	14±1
28	15±1
29	-
30	8±1
31	14±1
32	-
33	-
34	-
35	8±1

* Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost eksperimenta ± standardna devijacija, a reprezentativni eksperiment je prikazan

Značajnu inhibitornu aktivnost na proces formiranja biofilmova *S. marcescens* pokazala su tri derivata (**29**, **34** i **35**), sa BFIC₅₀ vrednostima od 50 µM (Tabela 21). Ostala testirana jedinjenja kao i polazni derivat nisu imala uticaja na proces formiranja biofilmova ovog soja.

Tabela 21. Inhibicija formiranja biofilmova kod *S. marcescens* *N'*-supstituisanim derivatima 4-amino-7-hlor-hinolinima izražena u koncentracijama koje odgovaraju BFIC₅₀ vrednostima.

Testirano jedinjenje	BFIC ₅₀ (µM)
4	-
28	-
29	50
30	-
31	-
32	-
33	-
34	50
35	50

4.3.4. Ispitivanje citotoksičnosti *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor hinolina na MRC5 ćelijskoj liniji

Citotoksičnost *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina ispitana je na ćelijama fibroblasta pluća (MRC5) MTT metodom i određene su njihove IC₅₀ vrednosti. Svi derivati pokazali su se citotoksičnim u koncentracijama koje pokazuju anti-virulentne aktivnosti (Tabela 22).

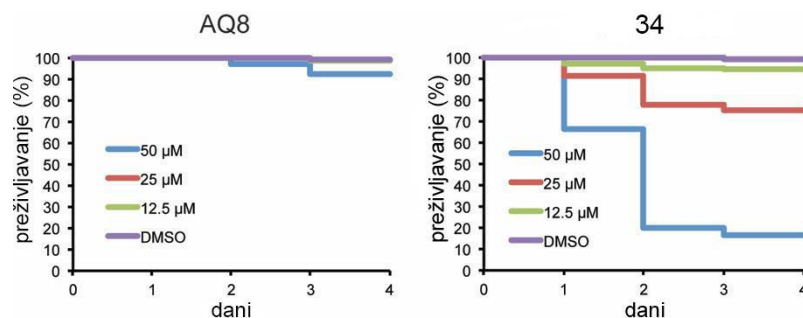
Tabela 22. Ispitivanje citotoksičnih efekata *N'*-supstituisanih 4-amino-7-hlor-hinolina na ćelijskoj liniji MRC5 nakon 48 sati tretmana. Citotoksičnost je izražena IC₅₀ vrednostima testiranih jedinjenja.

Testirano jedinjenje	IC ₅₀ (μM)
4	12,5
28	10
29	10
30	10
31	10
32	10
33	5
34	4
35	5

4.3.5. Ispitivanje citotoksičnosti *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor-hinolina na *in vivo* modelu *C. elegans*

Citotoksičnost jedinjenja **4** (AQ8) i **34** testirana je u *in vivo* model sistemu *C. elegans*. Eksperiment je izveden na larvama stadijuma L4 soja *C. elegans glp-4; sek-1*. Larve *C. elegans* su inkubirane u prisustvu jedinjenja u različitim koncentracijama i njihovo preživljavanje je praćeno tokom četiri dana brojanjem mrtvih i živih crva.

Jedinjenje **4** (AQ8) bilo je najmanje citotoksično za nematode. Pri koncentraciji ovog jedinjenja od 50 μM, zabeleženo je uginće od 3% drugog dana, odnosno 7% trećeg dana. Uginuća nematoda inkubiranih sa jedinjenjem **34** započela su posle 24 h. Najveći procent uginulih (35%) zabeležen je pri koncentraciji ovog jedinjenja od 50 μM dok su na nižim koncentracijama zabeležena uginuća od 8% (25 μM), odnosno 3% (12,5 μM). Trend je nastavljen tokom četiri dana, tako da je procent uginuća na najvećoj koncentraciji iznosio 80% dok je na nižim koncentracijama taj broj bio 22% odnosno 5% (Slika 37).



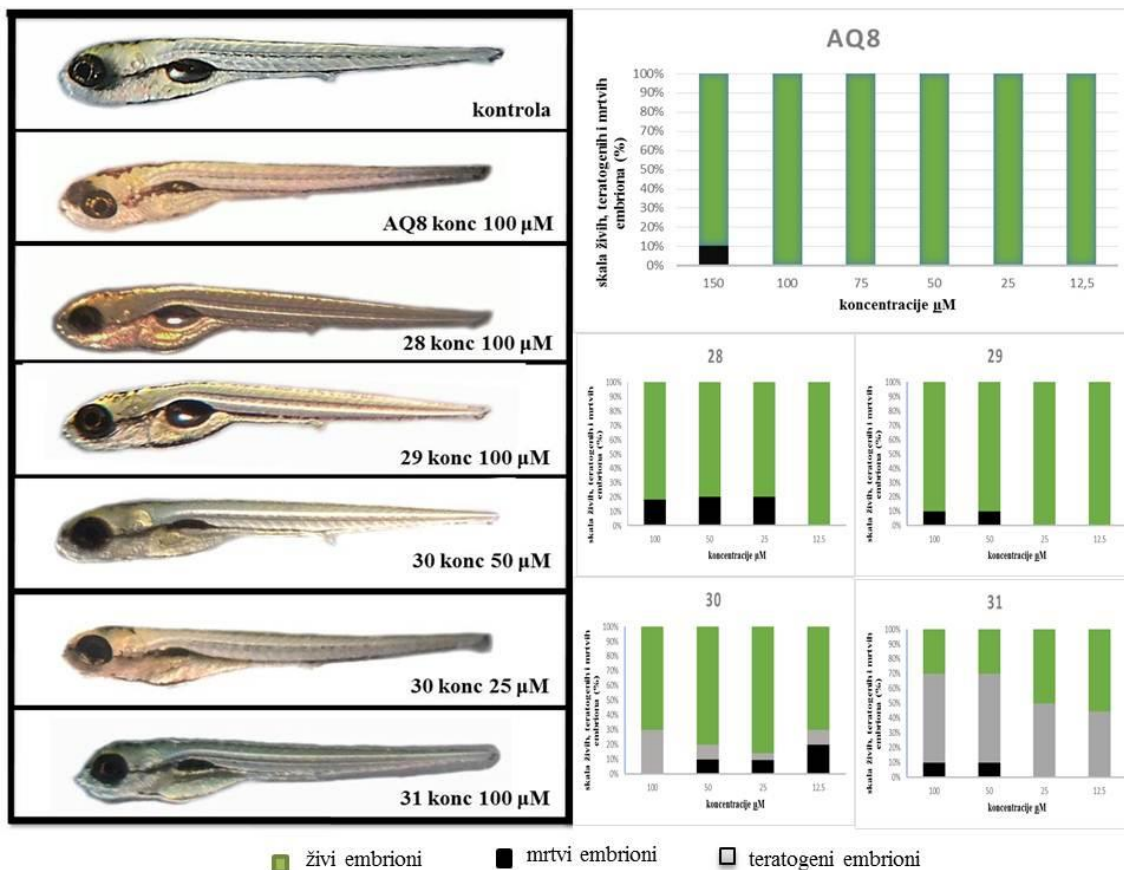
Slika 37. Kaplan-Majerove krive preživljavanja *C. elegans* u prisustvu različitih koncentracija jedinjenja **4** (AQ8) i derivata **34**.

4.3.6. Ispitivanje toksičnosti derivata *N'*-supstituisanih 4-amino-7-hlor-hinolina *in vivo* na modelu zebrice (*Danio rerio*)

Embrioni zebrica su tretirani u ranom stadijumu razvića, derivatima *N*-oktanamino-4-aminohinolina u koncentracionom opsegu od 12,5 µM do 150 µM. Uticaj jedinjenja je svakodneno praćen i to preživljavanje i pojava teratogenih malformacija do 120 čpf. Rezultati dobijeni na ovom model sistemu pokazali su da polazno jedinjenje **4** (AQ8), kao i derivati **28** i **29** i **32** nisu ispoljili toksično dejstvo u aktivnim koncentracijama (Slika 38 i 39), dok su se najtoksičnijim pokazala jedinjenja **35** i **36** i indukovala 100% mortalitet tokom ranog embrionalnog razvoja (do 48 čpf) pri svim testiranim dozama (Slika 39).

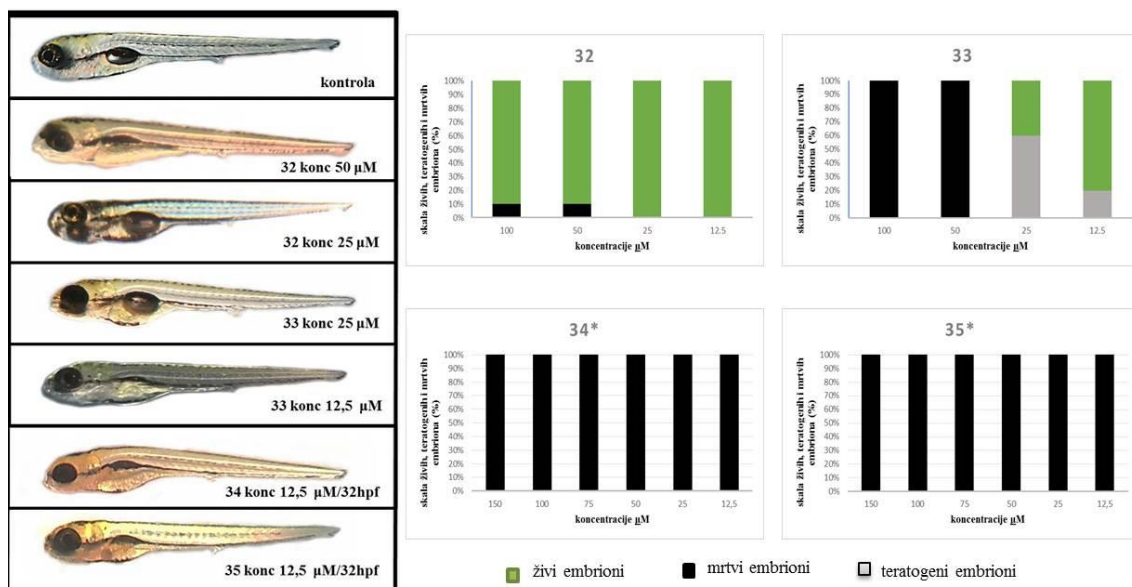
Primenom jedinjenja **30** javlja se fenomen inverzne toksičnosti, gde jedinjenja u visokim koncentracijama nisu toksična, dok se pri nižim koncentracijama toksični efekti ispoljavaju na embrionima (Slika 38)

Niže koncentracije izazivaju pojavu perikardijalnog edema. Jedinjenje **31** iziva pojavu teratogenih efekta na embrionima ribica, a njegova LC₅₀ vrednost je 83,5 µM.



Slika 38. Izgled zebra ribica 120 čpf, u prisustvu jedinjenja **4** (AQ8), odnosno **28** i **29** u najvišim testiranim koncentracijama 100 μM, jedinjenja **30** u koncentracijama 50 μM i 25 μM i jedinjenja **31** u koncentraciji 100 μM. Uticaj jedinjenja **4** (AQ8) i **28-31** na preživljavanje zebrića i pojavu teratogenih efekata, evaluirano nakon pet dana u prisustvu različitih koncentracija jedinjenja. Stanje embriona nakon 120 čpf evaluirano je pod mikroskopom, stereomikroskop (SMZ143-N2GG, Motic, Nemačka).

Jedinjenja **32** i **33** izazivaju inhibiciju razvoja ribljeg mehura, sa LC_{50} vrednostima 62,6 μM odnosno 35,3 μM. Jedinjenje **32** utiče na pravilan razvoj ekstremiteta. Zbog visoke toksičnosti jedinjenja **34** i **35** dodavana su i nakon 32 čpf, da bi se ispitalo njihov efekat na embrione koji su u kasnijoj razvojnoj fazi. Dodatkom jedinjenja **34** i **35** u koncentracionom opsegu od 12,5 μM do 100 μM 32 čpf, embrioni preživljavaju koncentraciju od 12,5 μM ali sa posledicama poput mikrocefalije, nekroze jetre i sa odustvom inflacije mehura (Slika 39).



Slika 39. Izgled zebra ribica 120 čpf, u prisustvu jedinjenja **32** u koncentracijama 50 μM i 25 μM , odnosno jedinjenja **33** u koncentracijama 25 μM i 12,5 μM i jedinjenja **34** i **35** u koncentracijama 12,5 μM . Uticaj jedinjenja **32-35** na preživljavanje zebrića i pojavu teratogenih efekata, evaluirano nakon pet dana u prisustvu različitih koncentracija jedinjenja. Stanje embriona nakon 120 čpf evaluirano je pod mikroskopom, stereomikroskop (SMZ143-N2GG, Motic, Nemačka).

5. DISKUSIJA

Rezistencija mikroorganizama na antibiotike postala je globalan problem usled sve učestalije pojave multirezistentnih bakterijskih vrsta ne samo u bolničkom okruženju, već i među sredinskim izolatima. Svetska zdravstvena organizacija objavila je listu prioriternih bakterija, izazivača infekcija, na osnovu antibiotiske multirezistencije i realne pretnje u slučaju nedostatka efikasne terapije. Na listi kritičnih patogena, drugo mesto zauzima *P. aeruginosa*, jer su pojedini sojevi ove vrste rezistentni na karbapenemske antibiotike koji predstavljaju poslednju generaciju antibiotika. Treće mesto zauzimaju vrste familije Enterobacteriaceae u koje spada vrsta *S. marcescens*, takođe zbog rezistencije na karbapeneme i cefalosporine treće generacije.

Jedna od strategija za smanjenje pojave i širenje rezistencije na antibiotike predstavlja razvoj i primena anti-virulentnih agenasa u borbi protiv bakterijskih infekcija, koji bi delovali putem smanjenja štetnog dejstva patogena uz manje doze antibiotika, što bi omogućilo imunom sistemu domaćina da se lakše izbori sa infekcijom. Kako je sinteza većine virulentnih karakteristika pod regulacijom međubakterijske komunikacije, smatra se da bi se inhibiranjem ovog procesa smanjila proizvodnja faktora virulencije, a time i virulentni potencijal patogena, što bi imunskom sistemu domaćina omogućilo da se lakše izbori sa infekcijom. Jedan od značajnih virulentnih faktora predstavlja forma biofilma, unutar koje su ćelije i do 1000 puta manje osetljive na antibakterijske agense (Balcazar *et al.*, 2015). Povećana otpornost biofilma na antibiotike obezbeđuje perzistentnost infekcijama baziranim na biofilmu uprkos terapiji antibioticima. Iz tog razloga neophodno je uvođenje novih terapeutika koji bi sprečavali formiranje biofilmova i/ili omogućili rasturanje već formiranih biofilmova (Bjarnsholt *et al.*, 2013).

5.1. Anti-virulentni agensi prirodnog porekla

Ljudi su oduvek prepoznavali „moć” prirode i u njoj tražili lekove za najrazličitija stanja. I danas veliki broj komercijalno dostupnih lekova u osnovi predstavljaju prečišćena jedinjenja prirodnog porekla. Različiti lokaliteti sa živim svetom u njemu mogu biti potencijalni izvor novih bioaktivnih jedinjenja koja mogu imati primenu u lečenju velikog broja različitih oboljenja uključujući i različite vrste infekcija.

Kolekcija mikroorganizama Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), sadrži preko 500 bakterija izolovanih sa različitih lokaliteta, i pretraživana je tokom ove studije u cilju pronalaska novih molekula prirodnog porekla sa anti-virulentnim potencijalom.

Ekstrakt soja *Lysinibacillus* sp. BV152.1, izolovan iz rizosfere biljke dobračice, pokazao je sposobnost inhibicije formiranja biofilмова kod *P. aeruginosa* PAO1, a hemijskim analizama ustanovljeno je da aktivnu komponentu čini smeša ramnolipida. Vrste roda *Lysinibacillus* su zemljišne bakterije i poznate su po tome da mogu da katabolizuju različita jedinjenja (nitrofenol, kaprolaktam, dihlormetan). Većina vrsta ovog roda živi pod ekstremnim uslovima sredine i potencijalno mogu da vrše bioremedijaciju kontaminiranih staništa. U literaturi se mogu naći brojni radovi o sojevima roda *Lysinibacillus* izolovanih iz zemljišta koji imaju sposobnost biodegradacije. Jedan od sojeva roda *Lysinibacillus* izolovan iz zemljišta je pokazao da ima sposobnost da vrši biodegradaciju herbicida fomesafena (difetil ester). Takođe je pokazano da ovaj soj može da degradira laktofen 60,4% i fluoroglikofen 86,4% (Liang *et al.*, 2009). Soj BV152.1 je najbliži vrstama *L. sphaericus* i *L. fusiformis* na osnovu identičnosti sa 16S rRNK sekvencom (99%). Godine 2010. opisana je vrsta *L. xylanilyticus*, izolovana iz humusa šumskog ekosistema, koja može da degraduje ksilan (C. S. Lee *et al.*, 2010). Vrsta *L. fusiformis* S9 sintetiše biosurfaktante koji deluju na sojeve *Escherichia coli* i *Streptococcus mutans*, pri čemu je na koncentraciji od 40 µg/ml uočena potpuna inhibicija formiranja biofilma kod oba soja, bez uticaja na rast bakterija (Pradhan *et al.*, 2014).

U značajne proizvođače ramnolipida spada oportuna vrsta *P. aeruginosa*, a *Burkholderia pseudomallei* (Hausler *et al.*, 1998) i *B. plantarii* (Howe *et al.*, 2006) su takođe patogene vrste proizvođači ramnolipida. Neke nepatogene vrste koje proizvode ramnolipide pripadaju rodu *Pseudomonas* i to *P. putida* i *P. chlororaphis* (Gunther *et al.*, 2005; Tuleva *et al.*, 2002). Ramnolipidi su biodegradibilna, termostabilna, pH neutralna jedinjenja koja tolerišu visoke koncentracije soli (Muller *et al.*, 2012). Kao surfaktanti i emulgatori, ramnolipidi smanjuju površinski napon tečnosti što omogućava transport hidrofobnih supstanci (Beal i Betts, 2000), a karakteriše ih i niska toksičnost (Santos *et al.*, 2016).

Uloga ramnolipida u fiziologiji bakterija nije razjašnjena u potpunosti, ali je poznato da mogu biti virulentni faktori, da imaju uticaj na formiranje biofilмова i pokretljivost i da imaju antimikrobijalnu aktivnost protiv *P. aeruginosa* (Dobler *et al.*, 2016), kao i na brojne Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, a takođe imaju i antiviralna, antifungalna, algicidna i zoosporicidna svojstva (Cosson *et al.*, 2002). Antimikrobijalna i anti-biofilm aktivnost ramnolipida izolovanih iz sojeva *P. aeruginosa* pokazana je na vrsti *Bordetella bronchiseptica* (Irie *et al.*, 2005). Biosurfaktanti se mogu koristiti i kao antibakterijski agensi protiv vrsta *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* i *Propidiobacterium acnes* u niskim koncentracijama (Diaz De Rienzo *et al.*, 2016). Pokazana je i inhibicija adhezije od 80% *B. pumilus* na podlozi od polistirena nakon jednočasovnog tretmana ramnolipidima u niskim koncentracijama (Dusane *et al.*, 2010). Koinkubacija egzogenih ramnolipida i *P. aeruginosa* sp. dovodi do remećenja adhezije ćelija za podlogu i daljeg formiranja biofilмова (Davey *et al.*, 2003). Takođe je pokazana i njihova uloga u zaštiti životne sredine je imaju sposobnost da biodegradiju organske komponente (Maier i Soberon-Chavez, 2000).

S obzirom da je *P. aeruginosa* sp. najpoznatiji proizvođač ramnolipida, u ovoj studiji poređene su aktivnosti ramnolipida izolovanih iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 sa komercijalno dostupnim ramnolipidima iz *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* sintetiše uglavnom monoramnolipide (Ochsner *et al.*, 1995), dok 63% ramnolipida dobijenih iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 čine di-ramnolipidi sa C10 dugim lancima, a manji udeo čine di-ramnolipidi sa C8 i C10 lancima masnih kiselina (17%), kao i di-ramnolipidi sa C10 i C12 (17%), dok ostatak čine monoramnolipidi.

Ramnolipidi imaju biosurfaktantsko dejstvo i deluju tako što remete inicijalni korak adhezije prilikom formiranja biofilмова na različitim površinama (Neu, 1996; Sodagari *et al.*, 2013; Vatsa *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2015).

Di-ramnolipidi izolovani iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 ne pokazuju antibakterijsko dejstvo u koncentracijama do 500 µg/ml, te se mogu razmatrati kao agensi sa anti-virulentnim svojstvima. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima u kojima je pokazano da di-ramnolipidi *P. aeruginosa* imaju MIK vrednosti od 4 do 32 mg/ml na sojevima *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Streptococcus faecalis* i nekim sojevima gljiva (Benincasa *et al.*, 2004; Vatsa *et al.*, 2010).

Najznačajniju aktivnost di-ramnolipida predstavlja njihov anti-biofilm potencijal što je pokazano u više studija (De Rienzo i Martin, 2016; Dusane *et al.*, 2010; Irie *et al.*, 2005). Di-ramnolipidi dobijeni iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1, inhibiraju formiranje biofilмова laboratorijskog soja *P. aeruginosa* PAO1, ali i multirezistentnog kliničkog izolata *P. aeruginosa* DM50. Značajno je da se inhibicija formiranja biofilмова ramnolipidima ostvaruje na različitim površinama, kao što su staklo ili površina silikonskog medicinskog katetera. Di-ramnolipidi stimulatívno deluju na rojenje kod *P. aeruginosa*, i na taj način mogu pospešivati izlazak ćelija iz biofilma. Di-ramnolipidi u koncentraciji od 50 µg/ml sprečavaju formiranje biofilмова, dok na nižim koncentracijama pokazuju inhibitorski efekat na maturaciju biofilмова. Ovi rezultati slični su rezultatima istraživanja u kojima je pokazano da glikolipidi izolovani iz soja *L. fusiformis* S9 inhibiraju adheziju bakterija i remete formiranje biofilмова kod *E. coli* i *S. mutans* bez uticaja na rast bakterija (Pradhan *et al.*, 2014). Takođe u studiji aktivnosti di-ramnolipida na rasturanje formiranih biofilмова pokazano je da prečišćeni di-ramnolipidi iz različitih izvora uspešno rasturaju formiran biofilma soja *P. aeruginosa* PAO1, di-ramnolipidi prečišćeni iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 primenjen u koncentraciji 12.5 µg/ml rastura 50% formiranog biofilma, dok di-ramnolipid izolovan iz *P. aeruginosa* istu aktivnost ima primenjen u koncentraciji od 50 µg/ml. Ranija istraživanja su pokazala da di-ramnolipidi soja *P. aeruginosa* ATCC9027 potpuno rasturaju zreo biofilma soja *P. aeruginosa* PAO1 u koncentraciji od 150 µg/ml (Davey *et al.*, 2003).

Karboksilna grupa bioaktivnih jedinjenja može da se modifikuje raznim amidnim jedinjenjima u cilju njenog „maskiranja”, što može imati za posledicu povećanje lipofilnosti molekula, a time i povećanje njegove bioaktivnosti (Guan *et al.*, 2014). U ovom istraživanju po prvi put su hemijski modifikovani di-ramnolipidi u cilju povećanja njihove biosurfaktantske aktivnosti. Dobijena su tri tipa amidnih derivata koji su hemijski okarakterisani i funkcionalno ispitani. Najveću inhibitornu aktivnost na formiranje biofilmova pokazao je derivat sa morfolinskom grupom kako kod *P. aeruginosa*, tako i kod *S. marcescens*. Doprinos morfolina bioaktivnostima jedinjenja je već prepoznat, npr. u slučaju antibiotika levofloksacina, kome je ovaj tip derivatizacije povećao aktivnost protiv sojeva *P. aeruginosa* (Yoshida *et al.*, 2006).

Generalno gledano, jedinjenja derivatizovana morfolinskom grupom pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, među kojima su posebno značajne antibakterijska i antiproliferativna aktivnost (Hirokawa *et al.*, 2009; Jakubowska *et al.*, 2008). Derivatizacija di-ramnolipida, sa druge strane, nije značajno povećala njihovu sposobnost da rasturaju zrele biofilme testiranih sojeva, osim u slučaju *S. marcescens* gde je uočljiva drastična razlika između derivata dobijenih iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 i *P. aeruginosa*. Ključnu ulogu u aktivnosti ramnolipida imaju šećeri, odnosno ramnoza, što je i potvrđeno gubitkom aktivnosti kontrolnog jedinjenja koje ima protektivnu grupu na ramnozi. Hemijskom karakterizacijom ovog jedinjenja dobijene su vrednosti HLB koje su najniže u poređenju sa drugim derivatima, kao i najviša vrednost logP što ukazuju na to da je ovo jedinjenje izgubilo amfifilnu prirodu ramnolipida.

Iz dosadašnjih istraživanja kao i iz literaturnih podataka može se zaključiti da su ramnolipidi jedinjenja sa velikim terapijskim potencijalom. Međutim, neka istraživanja svedoče da su ramnolipidi u koncentracijama od 100 µg/ml i 150 µg/ml toksični na nekoliko ćelijskih linija (Christova *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014). Di-ramnolipidi iz oba ispitivana izvora nisu pokazali citotoksični efekat na ćelijama fibroblasta pluća ljudi, dok je derivatizacija amidnim grupama dovela do povećanja njihove citotoksičnosti.

Činjenica da su di-ramnolipidi izuzetno potentni anti-biofilm agensi sa malom dozom toksičnosti ukazuje na njihovu moguću medicinsku primenu u kombinovanoj terapiji sa antibioticima radi povećanja efiksnosti terapije, naročito u slučaju lečenja hroničnih infekcija praćenih formiranjem biofilmova.

Pored toga, di-ramnolipidi bi mogli naći primenu kao dezinfekcioni agensi medicinskih instrumenata, kao i za oblaganje medicinskih pomagala koja dolaze u kontakt sa tkivima, kako bi se sprečila adhezija bakterija na te površine. Male strukturne promene di-ramnolipida pokazale su se kao efikasne u smislu povećanja njihovih bioaktivnosti i predstavljaju dobru osnovu za dalja istraživanja koja bi išla u pravcu optimizacije njihovih aktivnosti, vodeći pri tome računa o problemu citotoksičnosti koji se može pojaviti kao posledica hemijske promene.

5.2. Hemijski sintetisana jedinjenja kao anti-virulentni agensi

Hinolini su heterociklična jedinjenja koja se nalaze u mnogim prirodnim i polusintetskim proizvodima. Jedinjenja koja u osnovi imaju hinolinsko jezgro pokazuju širok spektar bioaktivnosti pa se ovoj farmakofori već dugi niz godina pridaje veliki značaj u oblasti razvoja lekova. Derivati hinolina različitih struktura poznati su kao antibakterijska (Lam, Gambari, *et al.*, 2014), antifungalna (Vandekerckhove *et al.*, 2013), antivirusna (Talamas *et al.*, 2014), antitumor (Lam, Lee, *et al.*, 2014) i antiinflamatorna (Ratheesh *et al.*, 2013) jedinjenja.

Veliki potencijal hinolina zasniva se na njihovoj aktivnosti u nanomolarnim i mikromolarnim koncentracijama na mnogim patogenim bakterijskim sojevima. Važnost farmakofore hinolina u razvoju novih derivata koji se mogu koristiti kao terapeutici, prepoznata je i priznata stečenim odobrenjem za kliničku upotrebu novog antibiotika 2012. godine, derivata hinolina, koji se koristi u terapijama infekcija izazvanih multirezistentnom *M. tuberculosis* (Andries *et al.*, 2005).

Od pre dvadesetak godina, neki derivati hinolina poznati su i kao anti-virulentni agensi. Antibiotik Nitroksolin, 5-nitro-8-hidroksi hinolin, upotrebljava se kao antibiotik sa selektivnim delovanjem na *P. aeruginosa*, ali je pokazano da u subinhibitornim koncentracijama pokazuje i anti-virulentno dejstvo (Sobke *et al.*, 2012). Od velike važnosti su derivati hinolina koji aktivno deluju na pojedine sojeve bakterija i gljiva, planktonske ili u biofilmu, što implicira da takva jedinjenja mogu potencijalno biti terapeutici za lečenje mešovutih infekcija koje su najčešće u kliničkoj praksi (Zuo *et al.*, 2016). U cilju identifikacije i razvoja novih anti-virulentnih agenasa u ovom istraživanju je sintetisana biblioteka derivata 4-aminohinolina, koji su se međusobno razlikovali na osnovu dužine alifatičnog lanca na poziciji C4 i substituenata na poziciji C7 i testirani su na patogenim bakterijskim vrstama *P. aeruginosa* i *S. marcescens*.

P. aeruginosa ima četiri sistema međubakterijske komunikacije sa različitim autoinducerima, različiti HSL, hinolini i karbalehidi, dok *S. marcescens* poseduje samo *N*-acil homoserin laktonski zavisani signalni put sa najmanje četiri različita laktonska autoinducera (Wei i Lai, 2006). U literaturi postoje podaci o različitim derivatima hinolina kao efikasnim inhibitorima međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa*.

U poznate inhibitore međubakterijske komunikacije *S. marcescens* spadaju analozi *N*-acil homoserin laktona (Morohoshi *et al.*, 2007), dok uticaj hinolina i njihovih derivata na ovu bakterijsku vrstu do sada nije opisan.

Jedinjenja **9** i **10** koja imaju CF₃ grupu u položaju C(7) i *N*-alifatične lance C8 i C12 u položaju C(4) sintetisana su po prvi put u ovoj studiji. Baktericidna aktivnost ovih jedinjenja na *P. aeruginosa* nije značajna, dok je ustanovljena vrlo slaba antibakterijska aktivnost na *S. marcescens* u opsegu od 565 do 1800 µM. S obzirom na neznatnu antibakterijsku aktivnost derivata hinolina, ispitivan je njihov anti-virulentni potencijal, odnosno mogućnost ovih jedinjenja da remete sistem međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* i *S. marcescens*. Svi derivati, osim jedinjenja **5** i **10** (atom hlora ili CF₃ grupa u položaju C(7) i alifatični C12 niz, pokazali su efekat na sintezu prodigiozina kod *S. marcescens*. Derivati sa kraćim alifatičnim lancima imali su veću sposobnost inhibicije proizvodnje prodigiozina i to najveću za jedinjenje **1** (C2 niz) 22mm, dok je primenom jedinjenja **2**, **3** i **4** (C4, C6 i C8) prečnika zone inhibicije iznosio 14mm. Sa druge strane, sva jedinjenja osim jedinjenja **7** (C4 niz) pokazala su inhibitorni efekat na proizvodnju violaceina, ljubičastog pigmenta *C. violaceum*, čija je sinteza regulisana homoserin laktomima kratkog lanca. Ovi rezultati su ukazali na to da ispitivani derivati 4-aminohinolina mogu uticati na HSL-regulisanu međubakterijsku komunikaciju. Ispitivanjem efekta ovih jedinjenja na proces formiranja biofilмова kod *S. marcescens* uočeno je da su samo jedinjenja **5** (7-Cl, C12 niz) i **10** (7-CF₃, C12 niz), koja ne utiču na sintezu prodigiozina, aktivni anti-biofilm agensi sa BFIC₅₀ vrednostima 69 i 63 µM. Jedinjenja **5** i **10** su prva do sada opisana jedinjenja hinolinske prirode koja pokazuju sposobnost inhibicije formiranja biofilma kod *S. marcescens*. S obzirom da jedinjenja sa kraćim lancima ne inhibiraju formiranje biofilмова, može se zaključiti da ova aktivnost u većoj meri zavisi od dužine alifatičnog lanca, a manje od supstitucije u položaju C(7). Sami diaminoalkani različite dužine niza nisu pokazali nikakav efekat na formiranje biofilмова što potvrđuje da je aktivnost jedinjenja **5** i **10** vezana za prisustvo hinolinskog jezgra.

Poznato je da su hromatografski parametri jedinjenja u reverzno faznim uslovima u korelaciji sa osobinama jedinjenja koja bitno utiču na biološku aktivnost, kao što su transport kroz ćelijsku membranu, vezivanje sa proteinima plazme ili interakcije sa ciljanim receptorima (Milosevic *et al.*, 2014; Segan *et al.*, 2014). Analizom ovih parametara dobijenih za derivate 4-aminohinolina iz ove studije ustanovljeno je da veličina i grananje molekula značajno doprinose njihovoj sposobnosti da inhibiraju formiranje biofilmova. Pored toga, i velika lipofilnost molekula doprinosi aktivnosti derivata **5** i **10** da inhibiraju formiranje biofilmova. Testiranjem sposobnosti 4-aminohinolina da inhibiraju formiranje biofilmova kod *P. aeruginosa* pokazano je da jedinjenje **4** (AQ8) inhibira formiranje za 60% čak i u najnižim testiranim koncentracijama, za razliku od *S. marcescens* kod koje ovo jedinjenje nije bilo aktivno. Jedinjenja **5** i **10** (7-Cl i 7-CF₃ substituenti sa C12 alkil-nizom) su izdvojena kao najaktivniji inhibitori formiranja biofilmova *P. aeruginosa*, a pretpostavljeni mehanizam delovanja je putem inhibicije međubakterijske komunikacije. Derivati **5** i **10** takođe su pokazali sposobnost da inhibiraju sintezu piocijanina, pri čemu se derivat **10** sa inhibitornom aktivnošću od IC₅₀ 2,5 µM svrstava u grupu najaktivnijih inhibitora sinteze piocijanina hinolinske prirode koji su do sada opisani. Benzamid-benzimidazol, jedinjenje koje je najpotentniji inhibitor sinteze piocijanina opisano do sada je 10 puta potentnije u poređenju sa jedinjenjem **10** (Starkey *et al.*, 2014). Derivat **10** pokazao je aktivnost sličnu derivatu 3-karboksamido-2-heptil-4-hinolona (Lu, Maurer, *et al.*, 2014), dok je 20 puta bio aktivniji od 2-alkil-4(3*H*)-hinazolinskog derivata (Ilangovan *et al.*, 2013).

Ispitivanjem mehanizma delovanja derivata 4-amino hinolina na signalne puteve međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* pokazano je da derivat **4** (AQ8) inhibira Las signalni put za 45%, dok jedinjenja **5** i **10** dovode do njegove stimulacije. Rezultat da jedinjenja **5** i **10** nisu inhibirala sintezu prodigiozina, čija je produkcija regulisana laktonima kratkog lanca, ukazao je na odsustvo uticaja ovih jedinjenja na C4-AHL-regulisan signalni put. To je i potvrđeno slabim uticajem ovih jedinjenja na Rhl signalni put kod *P. aeruginosa*. Najveći uticaj jedinjenja **5** i **10** pokazuju na PQS signalni put, inhibirajući sintezu autoinducera PQS/HHQ za 85% odnosno 75%. Ovi rezultati se slažu sa podacima iz literature koji su pokazali da su procesi formiranje biofilmova i sinteza piocijanina regulisani PQS sistemom međubakterijske komunikacije.

Ranije je pokazano da derivati 2-alkil-4-hinolina pokazuju antagonističku aktivnost prema PQS sistemu međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* (Lu *et al.*, 2012). Takođe, različiti analozi PQS molekula pokazali su sposobnost inhibicije receptora PqsR kod *P. aeruginosa* (Hodgkinson *et al.*, 2010). Kao izuzetno potentni inhibitori PQS signalnog puta sa aktivnostima u niskim mikromolarnim koncentracijama (5-10 μM) pokazali su se hinolini sa supstituisanim benzenovim prstenom i 3-alkil grupama (Lu, Kirsch, *et al.*, 2014), a njihovo dejstvo je potvrđeno i u *in vivo* uslovima (Lu, Maurer, *et al.*, 2014).

Iz rezultata ovog istraživanja se može zaključiti da 4-aminohinolini sa alifatičnim nizom dužine 12 metilenskih grupa inhibitorno deluju na PQS signalni put međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa* čime dovode do smanjenja proizvodnje virulentnog faktora piocijanina i inhibicije formiranja biofilмова, što što je u skladu sa rezultatima ranije opisanih sličnih derivata hinolina (Dubern i Diggle, 2008).

Jedinjenje **4** (AQ8) pokazalo je inhibitornu aktivnost prema formiranju biofilмова kod *P. aeruginosa*, ali je stimulisalo proizvodnju piocijanina. Sa druge strane, ovo jedinjenje se lakše sintetiše i prečišćava u odnosu na aktivnije C12 derivate, a pokazalo je i značajno veću rastvorljivost od C12 derivata. Stoga smo pokušali da derivatizacijom različitim *N'*-grupama postignemo povećanje sposobnosti inhibicije formiranja biofilмова, proizvodnje piocijanina, ali i drugih virulentnih faktora kod *P. aeruginosa*. Do sada je urađeno samo nekoliko studija koje su ispitivale aktivnosti hinolina supstituisanih benzil grupama.

Serijski kompleksnih derivata hinolina sa benzil grupama ispitana je u cilju evaluacije njihovih antifungalnih i antitumor aktivnosti, na sojevima *Aspergillus fumigatus* i *C. albicans* je ustanovljena najniža MIK vrednost od 2,5 $\mu\text{g/ml}$, a antitumor aktivnost na humanim tumorskim ćelijama (Shaikh *et al.*, 2017). Takođe, derivati hlora hinolina sa benzilidin anilinskim supstituentom pokazali su se kao efikasni inhibitori formiranja biofilмова kod različitih vrsta gljiva (Khan *et al.*, 2019).

Da bi se proučavao anti-virulentni potencijal *N'*-supstituisanih derivata 4-amino-7-hlor hinolina prvo je testirano njihovo dejstvo na rast *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens* gde je ustanovljeno da nemaju antibakterijsku aktivnost. Potom je pokazano da jedinjenja **29**, **31** i **32** pokazuju umerenu inhibiciju sinteze piocijanina 65, 45, odnosno 70%, dok su jedinjenja **33** i **34** pokazala znatnu aktivnost inhibicije od 90%.

Jedinjenja **33** i **34** inhibiraju proizvodnju piocijanina sa IC_{50} vrednostima od 25 μ M odnosno 12 μ M što je 6 puta manja aktivnosti koju ima jedinjenje **10** sa C12 alifatičnim nizom, ali je viša u odnosu na početno jedinjenje **4** (AQ8). Na formiranje biofilмова *P. aeruginosa* najveći uticaj imala su jedinjenja **33**, **34** i **35** sa $BFIC_{50}$ vrednostima od 50 μ M. Takođe, jedinjenje **34** imalo je najviše uticaja na grčenje *P. aeruginosa* sa efikasnošću od više od 95% pri koncentraciji od 50 μ M dok je jedinjenje **4** (AQ8) inhibiralo grčenje samo 30%. Jedinjenje **34** je slabije uticalo na sintezu elastaza od početnog jedinjenja **4** (AQ8).

Ispitivanjem mehanizma delovanja ovih jedinjenja u eseju kompeticije za receptor, ustanovljeno je da sva jedinjenja interaguju sa PQS sistemom međubakterijske komunikacije. Jedinjenje **34** inhibiralo je proizvodnju autoinducera ovog signalnog puta za 61% pri koncentraciji od 50 μ M. Jedinjenje **34** nije pokazalo značajan efekat na ekspresiju gena Las, Rhl i PQS sistema međubakterijske komunikacije. Rezultat da jedinjenje **34** značajno inhibira proizvodnju autoinducera PQS i HHQ mogao bi se objasniti sintezom nefunkcionalne sintaze ili njenom inaktivacijom. Da bi se pojasnio mehanizam delovanja, uspostavljen je model simulacije vezivanja jedinjenja za receptor čime je pokazano da se hinolinski prsten jedinjenja **34** smešta u isti hidrofobni “džep” kao i prirodni ligandi PqsR, HHQ i PQS ukazujući da je u pitanju kompetitivna inhibicija receptora. Modeli predikcije interakcija najaktivnijih jedinjenja iz ove studije svedoče o velikom afinitetu koja ova jedinjenja imaju prema receptoru. Međutim slaba rastvorljivost jedinjenja utiče na smanjenu uspešnost interakcije, jer su hinolini generalno slabo rastvorna jedinjenja. Prirodni autoinduceri PQS i HHQ se iz tog razloga transportuju membranskim vezikulama.

Uticaj jedinjenja **28-35** na rast *S. marcescens* nije bio značajan. Ispitivanjem njihovog efekta na formiranje biofilмова $BFIC_{50}$ vrednosti za jedinjenja **29**, **34** i **35** iznosile su 50 μ M, što ukazuje da su ova jedinjenja aktivnija od polaznog jedinjenja **4** (AQ8), dok isti ne deluju na sintezu prodigiozina (jednako ili manje dejstvo u poređenju sa jedinjenjem **4** (AQ8)). Na MRC5 ćelijskoj liniji ova jedinjenja pokazuju veću toksičnost od polaznog jedinjenja **4** (AQ8) i to u IC_{50} vrednostima 4 μ M za jedinjenje **34** i 5 μ M za jedinjenja **33** i **35**, dok je IC_{50} vrednost za ostala jedinjenja iznosila 10 μ M. Ispitivanjem na *in vivo* modelu *C. elegance* utvrđeno je da početno jedinjenje **4** (AQ8) nije toksično dok jedinjenje **34** pokazuje toksično dejstvo.

Posle 2 dana, pri koncentraciji od 50 μM procenat uginuća je iznosio 80%, dok je na nižim koncentracijama on iznosio 22%, odnosno 5%.

Modifikacije benzil grupama mogu specifično uticati na aktivnost derivata u smislu proširenja spektra aktivnosti. To je i pokazano prilikom ispitivanja inhibicije piocijanina, jer su neki derivati stekli ovu aktivnost za razliku od polaznog jedinjenja koje nije uticalo na sintezu piocijanina. Generalno male strukturne promene na hinolinskom jezgru mogu dovesti do povećane aktivnosti na patogenim sojevima *P. aeruginosa* i *S. marcescens*.

Derivati hinolina kao bioaktivna jedinjenja mogu služiti i kao dodatak terapiji, tj. kao adjuvanti antibioticima. Kombinovanom terapijom antibiotik bi se primenjivao u manjim dozama, a inhibiranjem sinteze virulentnih faktora imunski sistem bi se lakše izborio sa infekcijom. Iz svega navedenog se može zaključiti da hinolinsko jezgro predstavlja privilegovanu farmakoforu za razvoj potentnih anti-virulentnih agenasa koji pored sistemske ili topikalne primene za lečenje kako akutnih tako i hroničnih infekcija, mogu naći primenu i u funkcionalizaciji medicinskih materijala ili u dezinfekciji medicinskih pomagala. Strukturne modifikacije mogu povećati rastvorljivost derivata, ali i uticati na njihovu citotoksičnost. Sa druge strane, pokazano je i da prisustvo biosurfaktanata kao što su ramnolipidi može pospešiti rastvaranje PQS molekula, a time i njegovu aktivnost (Calfee *et al.*, 2005).

Ramnolipidi olakšavaju transport hidrofobnih molekula, odnosno pospešuju njihovu rastvorljivost, pre svega formiranjem micela na membrani, za šta se pretpostavlja da je mehanizam delovanja na povećanje rastvorljivost PQS molekula. Takođe ramnolipidi mogu ukloniti lipopolisaharide sa spoljašnje membrane *P. aeruginosa* i na taj način omogućiti transport slabije rastvornim molekulima (Al-Tahhan *et al.*, 2000). Iz ovoga se može zaključiti da bi kombinovana primena hinolina i biosurfaktanata tipa ramnolipida mogla da bude uspešna anti-virulentna terapija.

Derivati hinolina obezbeđuju visoku i selektivnu aktivnost kroz različite načine delovanja, kao i aktivnost u nanomolarnim i mikromolarnim koncentracijama. Svoju aktivnost ostvaruju na bakterijama i gljivama, na plantkonske ćelije ili one u sastavu biofilma što ih čini dobrim potencijalnim jedinjenjima za razvoj terapeutika koji bi bili usepšni u tretiranju mešovutih infekcija.

Nedavno je uveden obećavajući pristup u razvoju uspešnijih terapeutika, zasnovanih na sintezi hibridnih jedinjenja koja sadrže dve ili više farmakofore koji utiču na različite ciljeve i/ili koriste različite mehanizme delovanja. Pa su tako u cilju unapređenja aktivnosti jedinjenja hinolinske prirode, kao potentnih antimalarika, sintetisani hibridni molekuli sa dvostrukim dejstvom. Mehanizam aktivnosti, inhibicija formiranja hemozina ujedno sa ciljanjem na drugi molekularni mehanizam parazita *Plasmodium falciparum*, izazivača malarije, ne može biti prepoznat od strane proteina koji su uključeni u efluks pumpe (Kouznetsov i Gomez-Barrio, 2009).

Takva prednost ovim terapeutcima omogućava lečenje infekcija bez pojave restistencije, jer takav mehanizam aktivnosti do sada nije prepoznat od strane patogena. Ovakva strategija u dizajniranju novih terapeutika se može primeniti i za sinteze različitih tipova hibridnih molekula. U ovom istraživanju potvrđen je potencijal kako prirodnih biosurfaktanata, ramnolipida, tako i različitih derivata hinolina, pa bi hibridno jedinjenje, sastavljeno iz odabranih derivata hinolina i ramnolipida imalo veliki potencijal u lečenju infekcija izazvanih patogenim sojevima *P. aeruginosa* i *S. marcescens*.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati proizašli iz istraživanja u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na sledeće zaključke:

1. Ispitivanjem aktivnosti ekstrakata 155 bakterijska izolata iz Laboratorijske kolekcije mikroorganizama izdvojen je soj BV152.1 čiji ukupni etil acetatni ekstrakt inhibira formiranje biofilмова vrste *P. aeruginosa* PAO1 za 40%, bez antibakterijske aktivnosti. Sekvenciranjem gena za 16S rRNK ovaj izolat je identifikovan kao vrsta roda *Lysinibacillus*, dok su rezultati hemijskih analiza pokazali da je aktivni princip smeša ramnolipida koju čine di-ramnolipidi Rha-Rha-C10-C10 (63%), Rha-Rha-C10-C8 (17%), Rha-Rha-C10-C12 (17%), kao i monoramnolipidi (3%).
2. U poređnom analizom aktivnosti ramnolipida, odnosno smeše ramnolipida izolovanih iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 i komercijalno dostupne smeše ramnolipida vrste *P. aeruginosa* sp. R90 ustanovljeno je da je njihova efikasnost u inhibiranju formiranja biofilмова *P. aeruginosa* PAO1 približna (u opsegu 10-20% razlike) bez obzira da li su bakterije prošle fazu adheziju u procesu formiranja biofilмова ili ne, što ukazuje da se aktivnost smeše ramnolipida zasniva na inhibiciji rasta biofilмова, odnosno njihovog sazrevanja. Ispitivanjem uticaja smeše ramnolipida poreklom iz oba izvora na rojenje *P. aeruginosa* PAO1 ustanovljeno je da ramnolipidi utiču na otpuštanje pojedinačnih bakterija iz biofilma, odnosno dvode do disperzije.
3. Amidnom derivatizacijom di-ramnolipida poreklom iz oba izvora, uvođenjem benzena, piperidina i morfolina, povećan je njihov inhibitorni efekat na proces formiranja biofilмова kod *Pseudomonas* sojeva. Iako su na soju *P. aeruginosa* PAO1 svi derivati imali BFIC₅₀ vrednosti u mikrogramskom opsegu, jedino su derivati sa morfolinskom grupom pokazali doznu zavisnost. Inhibicija formiranja biofilмова kliničkog izolata derivatima di-ramnolipida je bila manje efikasna kod kliničkog izolata DM50, gde je derivat sa morfolinskom grupom izolovan iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 bio više od dva puta aktivniji od istog derivata poreklom iz drugog izvora.

4. Ispitivanjem uticaja ramnolipida i njihovih derivata na strukturu i integritet formiranih biofilmova soja PAO1 pokazano je da ramnolipidi poreklom iz soja *Lysinibacillus* sp. BV152.1 imaju veću sposobnost dezintegracije formiranih biofilmova od smeše ramnolipida R90, poreklom iz *Pseudomonas* sp., kao i da je amidna derivatizacija dovela do blagog povećanja ove aktivnosti. Smeša ramnolipida frakcije F3 nije pokazala sposobnost da dezintegriše formirani biofilm kliničkog soja *P. aeruginosa* DM50, dok se sa derivatizacijom di-ramnolipida F3 ova sposobnost povećala.
5. Amidni derivati di-ramnolipida poreklom iz oba izvora su imali najveći inhibitorni efekat na proces formiranja biofilmova kod *S. marcescens* ATCC27117, i to sa inhibitornom vrednošću od 62% za di-ramnolipide F3 i 85% za di-ramnolipide R90. Derivatizacijom di-ramnolipida F3 frakcije njihova aktivnosti se povećala za približno 20%, a kao najefikasniji inhibitor formiranja biofilma se izdvojio derivat sa morfolinskom grupom. Derivatizacija di-ramnolipida R90 nije dovela do povećanja ove aktivnosti. Sposobnost dezintegracije formiranih biofilmova vrste *S. marcescens* jedino su pokazali derivati frakcije F3 sa benzenom i morfolinom. Derivati R90 nisu imali nikakvog efekta, a čak su u pojedinim slučajevima stimulisali formiranje biofilma ovog soja.
6. Celokupni rezultati istraživanja anti-virulentnih karakteristika ramnolipida i derivata di-ramnolipida izolovanih iz dve različite bakterije, *Lysinibacillus* sp. BV152.1 i *P. aeruginosa* sp. R90, ukazuju na veliki potencijal ovih jedinjenja kao anti-virulentnih agenasa, kao i značaj vrste amidne derivatizacije na povećanje anti-biofilm aktivnosti di-ramnolipida.
7. Ispitivanjem anti-virulentne aktivnosti derivata 4-aminohinolina pokazano je da male strukturne promene dovode do razvoja njihove anti-virulentne aktivnosti prema sojevima *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens* ATCC 27117 uz pojavu slabe antibakterijske aktivnosti. Iz prve grupe derivata 4-aminohinolina kao najaktivniji molekuli, izdvojila su se jedinjenja koja su sadržala atom hlora ili CF₃ grupu u položaju C(7) i amino-alifatični lanac sa 12 metilenskih grupa u položaju C(4) (jedinjenja **5** i **10**).

8. Jedinjenja **5** i **10** smanjuju produkciju pigmenta piocijanina, ali ne pokazuju uticaj na proizvodnju prodigiozina. Jedinjenje **10** sa IC_{50} vrednošću od $2.5 \mu\text{M}$ izdvaja se kao najpotentniji inhibitor proizvodnje piocijanina hinolinske prirode.
9. Jedinjenja **5** i **10** pokazuju inhibitorno dejstvo na proces formiranja biofilmova kod *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens*, pri čemu su ova jedinjenja prvi opisani inhibitori formiranja biofilmova *S. marcescens* hinolinske prirode.
10. Kvantifikacijom proizvedenih autoinducera signalnih puteva međubakterijske komunikacije ustanovljeno je da jedinjenja **5** i **10** remete PQS signalni put što je i potencijalni mehanizam delovanja ovih jedinjenja.
11. Ispitivanjem kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti pokazano je da derivati dugog lanca bez grananja imaju veći uticaj na međubakterijsku komunikaciju, kao i to da lipofilnost molekula utiče na postojanje/odsustvo anti-biofilm aktivnosti. Pokazano je da su najaktivniji derivati ove grupe 4-amino-7-hlor-hinolini i da je značajan faktor koji doprinosi njihovoj aktivnosti dužina alifatičnog niza u položaju C(4), konkretno 12C atoma alifatičnog niza.
12. Optimizacijom strukture *N*-oktanamino-4-aminohinolina (jedinjenje **4** odnosno AQ8) sintetisani su *N'*-supstituisanih derivati u cilju ispitivanja uticaja benzil supstituenta na pojavu anti-virulentne aktivnosti. Derivatizacijom ovog jedinjenja *N'*-supstituisanih grupama kod 7 od 8 derivata pojavila se inhibitorna aktivnost na produkciju piocijanina *P. aeruginosa* PA14, međutim ta aktivnosti nije premašila jedinjenje **10**. Ustanovljeno je da je najaktivnije jedinjenje ove biblioteke derivata hinolina jedinjenje **34**, i to zbog redukcije proizvodnje piocijanina, dozno zavisnog smanjenja formiranja biofilmova *P. aeruginosa* PAO1 i *S. marcescens* (BFIC₅₀ vrednosti $50 \mu\text{M}$) i skoro potpunom inhibicijom grčenja.
13. Ispitivanjem mehanizma delovanja ove grupe jedinjenja ustanovljeno je da oni imaju najviše uticaja na PQS signalni put, i da deluju putem kompetitivne inhibicije vezujući se za receptor PqsR.

14. Model simulacije vezivanja za receptor jedinjenja **4** (AQ8) i njegovog najaktivnijeg derivata **34** ukazuje da se hinolinski prstenovi jedinjenja **34** i **4** (AQ8) vezuju za isti hidrofobni deo receptora. Pri tome bočni lanci derivata **34** pozicioniraju se na suprotnoj strani u poređenju sa bočnim lancem polaznog jedinjenja **4** (AQ8) zbog sternog položaja terminalnog *N*-substituenta koji je dodatno stabilizovan hidrofobnim interakcijama bočnih lanaca leucina i izoleucina, što povećava afinitet vezivanja jedinjenja **34** za PqsR receptor.
15. Ispitivanjem anti-virulentne aktivnosti različitih derivata 4-aminohinolina utvrđeno je da ova jedinjenja prvenstveno deluju na PQS signalni put *P. aeruginosa*, dok pojedina jedinjenja sprečavaju formiranje biofilмова *S. marcescens* za sada još uvek nerazjašnjenim mehanizom.
16. Male strukturne promene pokazuju veliki uticaj na aktivnost 4-aminohinolina, ali i na njihovu toksičnost, pri čemu povećanje aktivnosti prati i povećana citotoksičnost i toksičnost *in vivo*. Dalja optimizacija strukture ovih jedinjenja zahteva dve vrste promena, jednu u pravcu povećanja specifične aktivnosti i drugu u pravcu smanjenja toksičnosti.

7. LITERATURA

- Abdel-Mawgoud, A. M., Lepine, F., & Deziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol*, *86*(5), 1323-1336. doi: 10.1007/s00253-010-2498-2
- Adegbola, R. A., & Old, D. C. (1982). New fimbrial hemagglutinin in *Serratia* species. *Infect Immun*, *38*(1), 306-315.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., & Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol*, *66*(8), 3262-3268.
- Alberti, L., & Harshey, R. M. (1990). Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J Bacteriol*, *172*(8), 4322-4328.
- Aleksic, I., Ristivojevic, P., Pavic, A., Radojevic, I., Comic, L. R., Vasiljevic, B., . . . Senerovic, L. (2018). Anti-quorum sensing activity, toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and phytochemical characterization of *Trapa natans* leaf extracts. *J Ethnopharmacol*, *222*, 148-158. doi: 10.1016/j.jep.2018.05.005
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., . . . Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*, *59*(4), 1114-1128. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x
- Andric, F., Bajusz, D., Racz, A., Segan, S., & Heberger, K. (2016). Multivariate assessment of lipophilicity scales-computational and reversed phase thin-layer chromatographic indices. *J Pharm Biomed Anal*, *127*, 81-93. doi: 10.1016/j.jpba.2016.04.001
- Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Gohlmann, H. W., Neefs, J. M., Winkler, H., . . . Jarlier, V. (2005). A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, *307*(5707), 223-227. doi: 10.1126/science.1106753
- Ashkenazi, S., Weiss, E., & Drucker, M. M. (1986). Bacterial adherence to intravenous catheters and needles and its influence by cannula type and bacterial surface hydrophobicity. *J Lab Clin Med*, *107*(2), 136-140.
- Balcazar, J. L., Subirats, J., & Borrego, C. M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol*, *6*, 1216. doi: 10.3389/fmicb.2015.01216
- Basak, A., Abouelhasan, Y., & Huigens, R. W., 3rd. (2015). Halogenated quinolines discovered through reductive amination with potent eradication activities against MRSA, MRSE and VRE biofilms. *Org Biomol Chem*, *13*(41), 10290-10294. doi: 10.1039/c5ob01883h
- Beal, R., & Betts, W. B. (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*, *89*(1), 158-168.
- Benedik, M. J., & Strych, U. (1998). *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. *FEMS Microbiol Lett*, *165*(1), 1-13. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13120.x
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., & Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by

- Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85(1), 1-8. doi: 10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41
- Bergey, D. H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., Huntoon, F.M. (1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. *Williams and Wilkins*.
- Bhardwaj, A. K., Vinothkumar, K., & Rajpara, N. (2013). Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 8(1), 68-83.
- Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., & Hoiby, N. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov*, 12(10), 791-808. doi: 10.1038/nrd4000
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 13(1), 42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380
- Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol*, 75(4), 827-842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x
- Boucher, J. C., Yu, H., Mudd, M. H., & Deretic, V. (1997). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun*, 65(9), 3838-3846.
- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2011). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(6), 2655-2661. doi: 10.1128/AAC.00045-11
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Muller, R., & Haussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *J Bacteriol*, 187(11), 3630-3635. doi: 10.1128/JB.187.11.3630-3635.2005
- Brint, J. M., & Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol*, 177(24), 7155-7163.
- Bukhari, S., Banjar, A., Baghdadi, S., Baltow, B., Ashshi, A., & Hussain, W. (2014). Central line associated blood stream infection rate after intervention and comparing outcome with national healthcare safety network and international nosocomial infection control consortium data. *Ann Med Health Sci Res*, 4(5), 682-686. doi: 10.4103/2141-9248.141499
- Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2004). SadB Is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol*, 186(14), 4476-4485. doi: 10.1128/JB.186.14.4476-4485.2004
- Calfee, M. W., Shelton, J. G., McCubrey, J. A., & Pesci, E. C. (2005). Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa*-produced surfactant. *Infect Immun*, 73(2), 878-882. doi: 10.1128/IAI.73.2.878-882.2005
- Castro, A. J. (1967). Antimalarial activity of prodigiosin. *Nature*, 213(5079), 903-904.
- Chiang, W. C., Nilsson, M., Jensen, P. O., Hoiby, N., Nielsen, T. E., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2013). Extracellular DNA shields against aminoglycosides

- in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(5), 2352-2361. doi: 10.1128/AAC.00001-13
- Christensen, van Gennip, M., Rybtke, M. T., Wu, H., Chiang, W. C., Alhede, M., . . . Tolker-Nielsen, T. (2013). Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* foreign-body biofilm infections through reduction of the cyclic Di-GMP level in the bacteria. *Infect Immun*, 81(8), 2705-2713. doi: 10.1128/IAI.00332-13
- Christensen, A. B., Riedel, K., Eberl, L., Flodgaard, L. R., Molin, S., Gram, L., & Givskov, M. (2003). Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology*, 149(Pt 2), 471-483. doi: 10.1099/mic.0.25575-0
- Christova, N., Tuleva, B., Kril, A., Georgieva, M., Konstantinov, S., Terziyski, I., . . . Stoineva, I. (2013). Chemical structure and in vitro antitumor activity of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BN10. *Appl Biochem Biotechnol*, 170(3), 676-689. doi: 10.1007/s12010-013-0225-z
- Chung, P. Y., Bian, Z. X., Pun, H. Y., Chan, D., Chan, A. S., Chui, C. H., . . . Lam, K. H. (2015). Recent advances in research of natural and synthetic bioactive quinolines. *Future Med Chem*, 7(7), 947-967. doi: 10.4155/fmc.15.34
- Cochrane, S. A., Lohans, C. T., Brandelli, J. R., Mulvey, G., Armstrong, G. D., & Vederas, J. C. (2014). Synthesis and structure-activity relationship studies of N-terminal analogues of the antimicrobial peptide tridecaptin A(1). *J Med Chem*, 57(3), 1127-1131. doi: 10.1021/jm401779d
- Cockerill, F. R., Wikler, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., . . . Zimmer, B. L. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard M07-A9; Ninth edition
Clinical and Laboratory Standards Institute, 32(2), 1-63.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., . . . Kohler, T. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol*, 184(11), 3027-3033.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 41, 435-464. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251
- Coulthurst, S. J., Williamson, N. R., Harris, A. K., Spring, D. R., & Salmond, G. P. (2006). Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. *Microbiology*, 152(Pt 7), 1899-1911. doi: 10.1099/mic.0.28803-0
- Coutinho, I. R., Berk, R. S., & Mammen, E. (1988). Platelet aggregation by a phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Thromb Res*, 51(5), 495-505.
- Cruz-Camarillo, R., & de Cruz, C. G. (1968). [Isolation and purification of an extracellular protease of *Serratia marcescens*]. *Rev Latinoam Microbiol Parasitol (Mex)*, 10(3), 115-125.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., . . . Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461. doi: 10.1038/nature10388
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 185(3), 1027-1036.

- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, *280*(5361), 295-298.
- de Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*, *68*(9), 4839-4849.
- De Rienzo, M. A., & Martin, P. J. (2016). Effect of Mono and Di-rhamnolipids on Biofilms Pre-formed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Curr Microbiol*, *73*(2), 183-189. doi: 10.1007/s00284-016-1046-4
- Denning, G. M., Railsback, M. A., Rasmussen, G. T., Cox, C. D., & Britigan, B. E. (1998). *Pseudomonas pyocyanine* alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *Am J Physiol*, *274*(6 Pt 1), L893-900.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G., & Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(5), 1339-1344. doi: 10.1073/pnas.0307694100
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., & Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, *149*(Pt 8), 2005-2013. doi: 10.1099/mic.0.26154-0
- Diaz De Rienzo, M. A., Stevenson, P., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and -negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, *363*(2), fnv224. doi: 10.1093/femsle/fnv224
- Dobler, L., Vilela, L. F., Almeida, R. V., & Neves, B. C. (2016). Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *N Biotechnol*, *33*(1), 123-135. doi: 10.1016/j.nbt.2015.09.005
- Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L., & Zhang, L. H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol*, *68*(4), 1754-1759.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., & Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(7), 3526-3531. doi: 10.1073/pnas.060023897
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, *8*(9), 881-890. doi: 10.3201/eid0809.020063
- Drewry, D. H., & Macarron, R. (2010). Enhancements of screening collections to address areas of unmet medical need: an industry perspective. *Curr Opin Chem Biol*, *14*(3), 289-298. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.03.024
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, *67*(3), 351-368. doi: 10.2165/00003495-200767030-00003
- Duan, K., & Surette, M. G. (2007). Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J Bacteriol*, *189*(13), 4827-4836. doi: 10.1128/JB.00043-07

- Dubern, J. F., & Diggle, S. P. (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst*, 4(9), 882-888. doi: 10.1039/b803796p
- Dusane, D. H., Nanchaiah, Y. V., Zinjarde, S. S., & Venugopalan, V. P. (2010). Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 81(1), 242-248. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.07.013
- Eaves, G. N., & Jeffries, C. D. (1963). Isolation and Properties of an Exocellular Nuclease of *Serratia Marcescens*. *J Bacteriol*, 85(2), 273-278.
- Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S., Christiansen, G., Chhabra, S. R., . . . Givskov, M. (1996). Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol*, 20(1), 127-136.
- Espinosa-Valdes, M. P., Borbolla-Alvarez, S., Delgado-Espinosa, A. E., Sanchez-Tejeda, J. F., Ceron-Nava, A., Quintana-Romero, O. J., . . . Loza-Mejia, M. A. (2019). Synthesis, In Silico, and In Vitro Evaluation of Long Chain Alkyl Amides from 2-Amino-4-Quinolone Derivatives as Biofilm Inhibitors. *Molecules*, 24(2). doi: 10.3390/molecules24020327
- Eswaran, S., Adhikari, A. V., Chowdhury, I. H., Pal, N. K., & Thomas, K. D. (2010). New quinoline derivatives: synthesis and investigation of antibacterial and antituberculosis properties. *Eur J Med Chem*, 45(8), 3374-3383. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.04.022
- Euzéby, J. P. (2008). List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature.
- Fazli, M., Almlad, H., Rybtke, M. L., Givskov, M., Eberl, L., & Tolker-Nielsen, T. (2014). Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol*, 16(7), 1961-1981. doi: doi:10.1111/1462-2920.12448
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., & Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun*, 66(1), 43-51.
- Fletcher, M. P., Diggle, S. P., Cruz, S. A., Chhabra, S. R., Camara, M., & Williams, P. (2007). A dual biosensor for 2-alkyl-4-quinolone quorum-sensing signal molecules. *Environ Microbiol*, 9(11), 2683-2693. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01380.x
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*, 13(1), 34-40. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.010
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C., & Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 184(23), 6472-6480.
- Galloway, D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol*, 5(10), 2315-2321.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*, 67(3), 159-173. doi: 10.1111/2049-632x.12033
- Gerber, N. N. (1975). Prodigiosin-like pigments. *CRC Crit Rev Microbiol*, 3(4), 469-485.
- Givskov, M., Ostling, J., Eberl, L., Lindum, P. W., Christensen, A. B., Christiansen, G., . . . Kjelleberg, S. (1998). Two separate regulatory systems participate in control

- of swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, 180(3), 742-745.
- Gong, Z., Peng, Y., & Wang, Q. (2015). Rhamnolipid production, characterization and fermentation scale-up by *Pseudomonas aeruginosa* with plant oils. *Biotechnol Lett*, 37(10), 2033-2038. doi: 10.1007/s10529-015-1885-2
- Gonzalez-Juarbe, N., Mares, C. A., Hinojosa, C. A., Medina, J. L., Cantwell, A., Dube, P. H., . . . Bergman, M. A. (2015). Requirement for *Serratia marcescens* cytolysin in a murine model of hemorrhagic pneumonia. *Infect Immun*, 83(2), 614-624. doi: 10.1128/IAI.01822-14
- Govan, J. R., & Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*, 60(3), 539-574.
- Grimont, P. A., & Grimont, F. (1978). The genus *Serratia*. *Annu Rev Microbiol*, 32, 221-248. doi: 10.1146/annurev.mi.32.100178.001253
- Guan, A., Liu, C., Yang, X., & Dekeyser, M. (2014). Application of the intermediate derivatization approach in agrochemical discovery. *Chem Rev*, 114(14), 7079-7107. doi: 10.1021/cr4005605
- Gunther, N. W. t., Nunez, A., Fett, W., & Solaiman, D. K. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 71(5), 2288-2293. doi: 10.1128/AEM.71.5.2288-2293.2005
- Ha, D. G., Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A. (2014). Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol Biol*, 1149, 67-72. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0_8
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 95-108. doi: 10.1038/nrmicro821
- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 41(3), 276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., & Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119(2), 203-210.
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S. J., & Tolker-Nielsen, T. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59(3), 253-268. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 654-665. doi: 10.1038/nrmicro2199
- Haussler, S., Nimtz, M., Domke, T., Wray, V., & Steinmetz, I. (1998). Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun*, 66(4), 1588-1593.
- Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggie, S. P., Williams, P., & Camara, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev*, 35(2), 247-274. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00247.x
- Hejazi, A., & Falkiner, F. R. (1997). *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol*, 46(11), 903-912. doi: 10.1099/00222615-46-11-903
- Henrici, A. T. (1933). Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J Bacteriol*, 25(3), 277-287.

- Hert, J., Irwin, J. J., Laggner, C., Keiser, M. J., & Shoichet, B. K. (2009). Quantifying biogenic bias in screening libraries. *Nat Chem Biol*, 5(7), 479-483. doi: 10.1038/nchembio.180
- Hines, D. A., Saurugger, P. N., Ihler, G. M., & Benedik, M. J. (1988). Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*, 170(9), 4141-4146.
- Hirokawa, Y., Kinoshita, H., Tanaka, T., Nakamura, T., Fujimoto, K., Kashimoto, S., . . . Kato, S. (2009). Pleuromutilin derivatives having a purine ring. Part 2: influence of the central spacer on the antibacterial activity against Gram-positive pathogens. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(1), 170-174. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.10.123
- Hodgkinson, J., Bowden, S. D., Galloway, W. R., Spring, D. R., & Welch, M. (2010). Structure-activity analysis of the *Pseudomonas* quinolone signal molecule. *J Bacteriol*, 192(14), 3833-3837. doi: 10.1128/JB.00081-10
- Hoiby, N. (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl*(262), 1-96.
- Holden, M. T., Ram Chhabra, S., de Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., . . . Williams, P. (1999). Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*, 33(6), 1254-1266.
- Hoque, J., Konai, M. M., Gonuguntla, S., Manjunath, G. B., Samaddar, S., Yarlagadda, V., & Haldar, J. (2015). Membrane Active Small Molecules Show Selective Broad Spectrum Antibacterial Activity with No Detectable Resistance and Eradicate Biofilms. *J Med Chem*, 58(14), 5486-5500. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00443
- Horng, Y. T., Deng, S. C., Daykin, M., Soo, P. C., Wei, J. R., Luh, K. T., . . . Williams, P. (2002). The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol*, 45(6), 1655-1671.
- Howe, J., Bauer, J., Andra, J., Schromm, A. B., Ernst, M., Rossle, M., . . . Brandenburg, K. (2006). Biophysical characterization of synthetic rhamnolipids. *FEBS J*, 273(22), 5101-5112. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05507.x
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., . . . Hayashi, T. (2014). Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome Biol Evol*, 6(8), 2096-2110. doi: 10.1093/gbe/evu160
- Ilangovan, A., Fletcher, M., Rampioni, G., Pustelny, C., Rumbaugh, K., Heeb, S., . . . Williams, P. (2013). Structural basis for native agonist and synthetic inhibitor recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator PqsR (MvfR). *PLoS Pathog*, 9(7), e1003508. doi: 10.1371/journal.ppat.1003508
- Irie, Y., O'Toole G, A., & Yuk, M. H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol Lett*, 250(2), 237-243. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.012
- Jakubowska, J., Wasowska-Lukawska, M., & Czyz, M. (2008). STI571 and morpholine derivative of doxorubicin collaborate in inhibition of K562 cell proliferation by inducing differentiation and mitochondrial pathway of apoptosis. *Eur J Pharmacol*, 596(1-3), 41-49. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.08.021

- Jiang, L., Shen, C., Long, X., Zhang, G., & Meng, Q. (2014). Rhamnolipids elicit the same cytotoxic sensitivity between cancer cell and normal cell by reducing surface tension of culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(24), 10187-10196. doi: 10.1007/s00253-014-6065-0
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., . . . et al. (1993). The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J*, 12(6), 2477-2482.
- Kalaiarasan, E., Thirumalaswamy, K., Harish, B. N., Gnanasambandam, V., Sali, V. K., & John, J. (2017). Inhibition of quorum sensing-controlled biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quorum-sensing inhibitors. *Microb Pathog*, 111, 99-107. doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.017
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 634-644. doi: 10.1038/nrmicro2405
- Khan, F. A. K., Kaduskar, R. N., Patil, R., Patil, R. H., Ansari, S. A., Alkahtani, H. M., . . . Sangshetti, J. N. (2019). Synthesis, biological evaluations and computational studies of N-(3-(2-(7-Chloroquinolin-2-yl)vinyl) benzylidene)anilines as fungal biofilm inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 29(4), 623-630. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.12.046
- Khanafari, A., Assadi, M. M., & Fakhr, F. A. (2006). Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia msrcescens*. *Online Journal of Biological Science*, 6(1), 1-13.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. England, ISBN 0-7084-0623-8: John Innes Centre.
- Kim, B., Park, J. S., Choi, H. Y., Yoon, S. S., & Kim, W. G. (2018). Terrein is an inhibitor of quorum sensing and c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*: a connection between quorum sensing and c-di-GMP. *Sci Rep*, 8(1), 8617. doi: 10.1038/s41598-018-26974-5
- Kim, C., Kim, J., Park, H. Y., Lee, J. H., Park, H. J., Kim, C. K., & Yoon, J. (2009). Structural understanding of quorum-sensing inhibitors by molecular modeling study in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83(6), 1095-1103. doi: 10.1007/s00253-009-1954-3
- Kim, S.-K., & Lee, J.-H. (2016). Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, 54(2), 71-85. doi: 10.1007/s12275-016-5528-7
- King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L., & Lam, J. S. (2009). Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 15(5), 261-312. doi: 10.1177/1753425909106436
- Kipnis, E., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*, 36(2), 78-91. doi: 10.1016/j.medmal.2005.10.007
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol*, 48(6), 1511-1524.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., & Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*, 182(21), 5990-5996.

- Komori, Y., Nonogaki, T., & Nikai, T. (2001). Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). *Toxicon*, *39*(9), 1327-1332.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*, *15*(12), 740-755. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99
- Korner, R. J., Nicol, A., Reeves, D. S., MacGowan, A. P., & Hows, J. (1994). Ciprofloxacin resistant *Serratia marcescens* endocarditis as a complication of non-Hodgkin's lymphoma. *J Infect*, *29*(1), 73-76.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *3*(4), a010306. doi: 10.1101/cshperspect.a010306
- Kouznetsov, V. V., & Gomez-Barrio, A. (2009). Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. *Eur J Med Chem*, *44*(8), 3091-3113. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.02.024
- Kuo, A., Blough, N. V., & Dunlap, P. V. (1994). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol*, *176*(24), 7558-7565.
- Lam, K. H., Gambari, R., Lee, K. K., Chen, Y. X., Kok, S. H., Wong, R. S., . . . Chui, C. H. (2014). Preparation of 8-hydroxyquinoline derivatives as potential antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem Lett*, *24*(1), 367-370. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.10.072
- Lam, K. H., Lee, K. K., Gambari, R., Kok, S. H., Kok, T. W., Chan, A. S., . . . Tang, J. C. (2014). Anti-tumour and pharmacokinetics study of 2-Formyl-8-hydroxyquinolinium chloride as *Galipea longiflora* alkaloid analogue. *Phytomedicine*, *21*(6), 877-882. doi: 10.1016/j.phymed.2014.02.005
- Lamarche, M. G., & Deziel, E. (2011). MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS One*, *6*(9), e24310. doi: 10.1371/journal.pone.0024310
- Larson, E. L., Cimiotti, J. P., Haas, J., Nesin, M., Allen, A., Della-Latta, P., & Saiman, L. (2005). Gram-negative bacilli associated with catheter-associated and non-catheter-associated bloodstream infections and hand carriage by healthcare workers in neonatal intensive care units. *Pediatr Crit Care Med*, *6*(4), 457-461. doi: 10.1097/01.PCC.0000163669.37340.91
- LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, *77*(1), 73-111. doi: 10.1128/MMBR.00046-12
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., & Lazdunski, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol*, *21*(6), 1137-1146.
- Lau, G. W., Hasset, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*, *10*(12), 599-606. doi: 10.1016/j.molmed.2004.10.002
- Lazazzera, B. A., & Grossman, A. D. (1998). The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol*, *6*(7), 288-294.

- Lee, C. S., Jung, Y. T., Park, S., Oh, T. K., & Yoon, J. H. (2010). Lysinibacillus xylanilyticus sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from forest humus. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 2), 281-286. doi: 10.1099/ijs.0.013367-0
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., . . . Zhang, L.-H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol*, 9, 339. doi: 10.1038/nchembio.1225
- <https://www.nature.com/articles/nchembio.1225#supplementary-information>
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26-41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x
- Lee, K., & Yoon, S. S. (2017). Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*, 27(6), 1053-1064. doi: 10.4014/jmb.1611.11056
- Lee, X., Fox, A., Sufrin, J., Henry, H., Majcherczyk, P., Haas, D., & Reimann, C. (2010). Identification of the biosynthetic gene cluster for the Pseudomonas aeruginosa antimetabolite L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid. *J Bacteriol*, 192(16), 4251-4255. doi: 10.1128/JB.00492-10
- Leon, B., Haeckl, F. P., & Lington, R. G. (2015). Optimized quinoline amino alcohols as disruptors and dispersal agents of Vibrio cholerae biofilms. *Org Biomol Chem*, 13(31), 8495-8499. doi: 10.1039/c5ob01134e
- Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoresh, N., & Balaban, N. Q. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, 355(6327), 826-830. doi: 10.1126/science.aaj2191
- Liang, B., Lu, P., Li, H., Li, R., Li, S., & Huang, X. (2009). Biodegradation of fomesafen by strain Lysinibacillus sp. ZB-1 isolated from soil. *Chemosphere*, 77(11), 1614-1619. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.033
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., & Zhang, L. H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from Ralstonia strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol*, 47(3), 849-860.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 582-610. doi: 10.1128/CMR.00040-09
- Lu, C., Kirsch, B., Maurer, C. K., de Jong, J. C., Braunshausen, A., Steinbach, A., & Hartmann, R. W. (2014). Optimization of anti-virulence PqsR antagonists regarding aqueous solubility and biological properties resulting in new insights in structure-activity relationships. *Eur J Med Chem*, 79, 173-183. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.04.016
- Lu, C., Kirsch, B., Zimmer, C., de Jong, J. C., Henn, C., Maurer, C. K., . . . Hartmann, R. W. (2012). Discovery of antagonists of PqsR, a key player in 2-alkyl-4-quinolone-dependent quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. *Chem Biol*, 19(3), 381-390. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.01.015
- Lu, C., Maurer, C. K., Kirsch, B., Steinbach, A., & Hartmann, R. W. (2014). Overcoming the unexpected functional inversion of a PqsR antagonist in Pseudomonas aeruginosa: an in vivo potent antivirulence agent targeting pqs quorum sensing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53(4), 1109-1112. doi: 10.1002/anie.201307547
- Lyerly, D., & Kreger, A. (1979). Purification and characterization of a Serratia marcescens metalloprotease. *Infect Immun*, 24(2), 411-421.

- Ma, Q., Yang, Z., Pu, M., Peti, W., & Wood, T. K. (2011). Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environ Microbiol*, *13*(3), 631-642. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02368.x
- Mahlen, S. D. (2011). Serratia infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev*, *24*(4), 755-791. doi: 10.1128/CMR.00017-11
- Maier, R. M., & Soberon-Chavez, G. (2000). Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, *54*(5), 625-633.
- Maki, D. G., Hennekens, C. G., Phillips, C. W., Shaw, W. V., & Bennett, J. V. (1973). Nosocomial urinary tract infection with Serratia marcescens: an epidemiologic study. *J Infect Dis*, *128*(5), 579-587.
- Manderville, R. A. (2001). Synthesis, proton-affinity and anti-cancer properties of the prodigiosin-group natural products. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, *1*(2), 195-218.
- Martinez, A., Torello, S., & Kolter, R. (1999). Sliding motility in mycobacteria. *J Bacteriol*, *181*(23), 7331-7338.
- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martinez-Solano, L., & Sanchez, M. B. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, *33*(1), 44-65. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x
- Massai, F., Imperi, F., Quattrucci, S., Zennaro, E., Visca, P., & Leoni, L. (2011). A multitask biosensor for micro-volumetric detection of N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone quorum sensing signal. *Biosens Bioelectron*, *26*(8), 3444-3449. doi: 10.1016/j.bios.2011.01.022
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H., & Yano, I. (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of Serratia marcescens. *J Bacteriol*, *174*(6), 1769-1776.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., & Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from Pseudomonas aeruginosa PAO1. *J Bacteriol*, *183*(21), 6454-6465. doi: 10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., . . . Williams, P. (1997). Quorum sensing and Chromobacterium violaceum: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, *143* (Pt 12), 3703-3711. doi: 10.1099/00221287-143-12-3703
- McCoy, W. F., Bryers, J. D., Robbins, J., & Costerton, J. W. (1981). Observations of fouling biofilm formation. *Can J Microbiol*, *27*(9), 910-917.
- McInnis, C. E., & Blackwell, H. E. (2011). Thiolactone modulators of quorum sensing revealed through library design and screening. *Bioorg Med Chem*, *19*(16), 4820-4828. doi: 10.1016/j.bmc.2011.06.071
- Medina, G., Juarez, K., & Soberon-Chavez, G. (2003). The Pseudomonas aeruginosa rhlAB operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer N-butyl-homoserine lactone. *J Bacteriol*, *185*(1), 377-380.
- Medina, G., Juarez, K., Valderrama, B., & Soberon-Chavez, G. (2003). Mechanism of Pseudomonas aeruginosa RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter. *J Bacteriol*, *185*(20), 5976-5983.

- Meiss, G., Friedhoff, P., Hahn, M., Gimadutdinow, O., & Pingoud, A. (1995). Sequence preferences in cleavage of dsDNA and ssDNA by the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease. *Biochemistry*, *34*(37), 11979-11988.
- Merlino, C. P. (1924). Bartolomeo Bizio's Letter to the most Eminent Priest, Angelo Bellani, Concerning the Phenomenon of the Red Colored Polenta. *J Bacteriol*, *9*(6), 527-543.
- Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. (2005). Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol*, *Chapter 1*, Unit 1B 1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00
- Miao, E. A., Andersen-Nissen, E., Warren, S. E., & Aderem, A. (2007). TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol*, *29*(3), 275-288. doi: 10.1007/s00281-007-0078-z
- Milivojevic, D., Sumonja, N., Medic, S., Pavic, A., Moric, I., Vasiljevic, B., . . . Nikodinovic-Runic, J. (2018). Biofilm-forming ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals and humans. *Pathog Dis*, *76*(4). doi: 10.1093/femspd/fty041
- Milosevic, N. P., Stojanovic, S. Z., Penov-Gasi, K., Perisic-Janjic, N., & Kaliszan, R. (2014). Reversed- and normal-phase liquid chromatography in quantitative structure retention-property relationships of newly synthesized seco-androstene derivatives. *J Pharm Biomed Anal*, *88*, 636-642. doi: 10.1016/j.jpba.2013.10.011
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., & Forestier, C. (2016). Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol*, *7*, 592. doi: 10.3389/fmicb.2016.00592
- Montaner, B., Navarro, S., Pique, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E., . . . Perez-Tomas, R. (2000). Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol*, *131*(3), 585-593. doi: 10.1038/sj.bjp.0703614
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*, *7*, 39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039
- More, M. I., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A., & Winans, S. C. (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*, *272*(5268), 1655-1658.
- Morimoto, H., & Bonavida, B. (1992). Diphtheria toxin- and *Pseudomonas A* toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, *149*(6), 2089-2094.
- Morohoshi, T., Shiono, T., Takidouchi, K., Kato, M., Kato, N., Kato, J., & Ikeda, T. (2007). Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone. *Appl Environ Microbiol*, *73*(20), 6339-6344. doi: 10.1128/AEM.00593-07
- Morrison, D. A. (1966). Prodigiosin synthesis in mutants of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*, *91*(4), 1599-1604.
- Mudd, S., & Mudd, E. B. (1924). The Penetration of Bacteria through Capillary Spaces : Iv. A Kinetic Mechanism in Interfaces. *J Exp Med*, *40*(5), 633-645.
- Muller, M. M., Hormann, B., Kugel, M., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2011). Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. *Appl Microbiol Biotechnol*, *89*(3), 585-592. doi: 10.1007/s00253-010-2901-z

- Muller, M. M., Kugler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hormann, B., Pohnlein, M., . . . Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids--next generation surfactants? *J Biotechnol*, *162*(4), 366-380. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.022
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, *4*(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Musiol, R., Serda, M., Hensel-Bielowka, S., & Polanski, J. (2010). Quinoline-based antifungals. *Curr Med Chem*, *17*(18), 1960-1973.
- Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev*, *43*(4), 496-518.
- Neu, T. R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev*, *60*(1), 151-166.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, *75*(3), 311-335. doi: 10.1021/np200906s
- Nickzad, A., & Deziel, E. (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? *Lett Appl Microbiol*, *58*(5), 447-453. doi: 10.1111/lam.12211
- O'Loughlin, C. T., Miller, L. C., Siryaporn, A., Drescher, K., Semmelhack, M. F., & Bassler, B. L. (2013). A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(44), 17981-17986. doi: 10.1073/pnas.1316981110
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2003). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *285*(5), L1077-1086. doi: 10.1152/ajplung.00198.2003
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *287*(1), L94-103. doi: 10.1152/ajplung.00025.2004
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, *30*(2), 295-304.
- Ochsner, U. A., Fiechter, A., & Reiser, J. (1994). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem*, *269*(31), 19787-19795.
- Ochsner, U. A., Reiser, J., Fiechter, A., & Witholt, B. (1995). Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants in Heterologous Hosts. *Appl Environ Microbiol*, *61*(9), 3503-3506.
- Ohman, D. E., Cryz, S. J., & Iglewski, B. H. (1980). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol*, *142*(3), 836-842.
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *34*(5), 877-886. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z
- Olvera, C., Goldberg, J. B., Sanchez, R., & Soberon-Chavez, G. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*, *179*(1), 85-90. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08712.x
- Palleroni. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria. Genus *Pseudomonas*. *Springer*, 323-379.

- Palleroni. (2015). *Pseudomonas Bergey's Manual of systematics of Archaea and Bacteria*. Online ISBN: 9781118960608: John Wiley and sons, Inc. in association with Bergey's Manula Trust.
- Pamp, S. J., & Tolker-Nielsen, T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *189*(6), 2531-2539. doi: 10.1128/JB.01515-06
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *14*(9), 576-588. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89
- Park, S., Kim, H. S., Ok, K., Kim, Y., Park, H. D., & Byun, Y. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of 4-(alkyloxy)-6-methyl-2H-pyran-2-one derivatives as quorum sensing inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, *25*(15), 2913-2917. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.05.054
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R., & Zhou, W. W. (1990). Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, *58*(9), 3009-3014.
- Parrino, B., Schillaci, D., Carnevale, I., Giovannetti, E., Diana, P., Cirrincione, G., & Cascioferro, S. (2019). Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. *Eur J Med Chem*, *161*, 154-178. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.036
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr., & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(8), 4360-4365.
- Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., & Iglewski, B. H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, *260*(5111), 1127-1130.
- Passos da Silva, D., Castaneda-Ojeda, M. P., Moretti, C., Buonauro, R., Ramos, C., & Venturi, V. (2014). Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease. *Microbiology*, *160*(Pt 3), 556-566. doi: 10.1099/mic.0.074468-0
- Patriquin, G. M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E. P., & Poole, K. (2008). Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *190*(2), 662-671. doi: 10.1128/JB.01473-07
- Pavic, A., Savic, N. D., Glisic, B. D., Crochet, A., Vojnovic, S., Kurutos, A., . . . Djuran, M. I. (2019). Silver(I) complexes with 4,7-phenanthroline efficient in rescuing the zebrafish embryos of lethal *Candida albicans* infection. *J Inorg Biochem*, *195*, 149-163. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.017
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(1), 197-201.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(5), 1490-1494.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C., & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol*, *179*(18), 5756-5767.

- Pearson, J. P., Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol*, *181*(4), 1203-1210.
- Pekmezovic, M., Aleksic, I., Barac, A., Arsic-Arsenijevic, V., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., & Senerovic, L. (2016). Prevention of polymicrobial biofilms composed of *Pseudomonas aeruginosa* and pathogenic fungi by essential oils from selected Citrus species. *Pathog Dis*, *74*(8). doi: 10.1093/femspd/ftw102
- Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, *20*(4), 5286-5298. doi: 10.3390/molecules20045286
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(20), 11229-11234.
- Plotkowski, M. C., Pova, H. C., Zahm, J. M., Lizard, G., Pereira, G. M., Tournier, J. M., & Puchelle, E. (2002). Early mitochondrial dysfunction, superoxide anion production, and DNA degradation are associated with non-apoptotic death of human airway epithelial cells induced by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *26*(5), 617-626. doi: 10.1165/ajrcmb.26.5.4489
- Pradhan, A. K., Pradhan, N., Sukla, L. B., Panda, P. K., & Mishra, B. K. (2014). Inhibition of pathogenic bacterial biofilm by biosurfactant produced by *Lysinibacillus fusiformis* S9. *Bioprocess Biosyst Eng*, *37*(2), 139-149. doi: 10.1007/s00449-013-0976-5
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E., & Newman, D. K. (2006). Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol*, *2*(2), 71-78. doi: 10.1038/nchembio764
- Pulcini, E. (2001). Biofilms: sensing and signaling. *J Calif Dent Assoc*, *29*(5), 351-353.
- Pustelny, C., Albers, A., Buldt-Karentzopoulos, K., Parschat, K., Chhabra, S. R., Camara, M., . . . Fetzner, S. (2009). Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Biol*, *16*(12), 1259-1267. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.11.013
- Rahal, J. J. (2006). Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis*, *43 Suppl 2*, S95-99. doi: 10.1086/504486
- Rahim, R., Burrows, L. L., Monteiro, M. A., Perry, M. B., & Lam, J. S. (2000). Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *146* (Pt 11), 2803-2814. doi: 10.1099/00221287-146-11-2803
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S., & Soberon-Chavez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol*, *40*(3), 708-718.
- Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg, E. P., Bertani, I., Grasso, M., Venturi, V., . . . Leoni, L. (2007). *RsaL* provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, *66*(6), 1557-1565. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06029.x

- Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov*, 9(2), 117-128. doi: 10.1038/nrd3013
- Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology*, 152(Pt 4), 895-904. doi: 10.1099/mic.0.28601-0
- Ratheesh, M., Sindhu, G., & Helen, A. (2013). Anti-inflammatory effect of quinoline alkaloid skimmianine isolated from *Ruta graveolens* L. *Inflamm Res*, 62(4), 367-376. doi: 10.1007/s00011-013-0588-1
- Rice, S. A., Koh, K. S., Queck, S. Y., Labbate, M., Lam, K. W., & Kjelleberg, S. (2005). Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol*, 187(10), 3477-3485. doi: 10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005
- Riedel, K., Ohnesorg, T., Krogfelt, K. A., Hansen, T. S., Omori, K., Givskov, M., & Eberl, L. (2001). N-acyl-L-homoserine lactone-mediated regulation of the lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, 183(5), 1805-1809. doi: 10.1128/JB.183.5.1805-1809.2001
- Rossier, J., Nasiri Sovari, S., Pavic, A., Vojnovic, S., Stringer, T., Battig, S., . . . Zobi, F. (2019). Antiplasmodial Activity and In Vivo Bio-Distribution of Chloroquine Molecules Released with a 4-(4-Ethynylphenyl)-Triazole Moiety from Organometallo-Cobalamins. *Molecules*, 24(12). doi: 10.3390/molecules24122310
- Ruer, S., Pinotsis, N., Steadman, D., Waksman, G., & Remaut, H. (2015). Virulence-targeted Antibacterials: Concept, Promise, and Susceptibility to Resistance Mechanisms. *Chem Biol Drug Des*, 86(4), 379-399. doi: 10.1111/cbdd.12517
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2000). The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection*, 2(14), 1721-1731. doi: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01327-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01327-7)
- Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). doi: 10.1101/cshperspect.a012427
- Rybtke, M., Hultqvist, L. D., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *J Mol Biol*, 427(23), 3628-3645. doi: 10.1016/j.jmb.2015.08.016
- Saiman, L., & Prince, A. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest*, 92(4), 1875-1880. doi: 10.1172/JCI116779
- Salini, R., & Pandian, S. K. (2015). Interference of quorum sensing in urinary pathogen *Serratia marcescens* by *Anethum graveolens*. *Pathog Dis*, 73(6), ftv038. doi: 10.1093/femspd/ftv038
- Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int J Mol Sci*, 17(3), 401. doi: 10.3390/ijms17030401
- Schiebel, E., Schwarz, H., & Braun, V. (1989). Subcellular location and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J Biol Chem*, 264(27), 16311-16320.
- Schmitz, G., & Braun, V. (1985). Cell-bound and secreted proteases of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*, 161(3), 1002-1009.

- Schwarzer, C., Fischer, H., Kim, E. J., Barber, K. J., Mills, A. D., Kurth, M. J., . . . Illek, B. (2008). Oxidative stress caused by pyocyanin impairs CFTR Cl(-) transport in human bronchial epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, *45*(12), 1653-1662. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.011
- Scoffone, V. C., Chiarelli, L. R., Makarov, V., Brackman, G., Israyilova, A., Azzalin, A., . . . Buroni, S. (2016). Discovery of new diketopiperazines inhibiting *Burkholderia cenocepacia* quorum sensing in vitro and in vivo. *Sci Rep*, *6*, 32487. doi: 10.1038/srep32487
- Seed, P. C., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol*, *177*(3), 654-659.
- Segan, S., Terzic-Jovanovic, N., Milojkovic-Opsenica, D., Trifkovic, J., Solaja, B., & Opsenica, D. (2014). Correlation study of retention data and antimalarial activity of 1,2,4,5-mixed tetraoxanes with their molecular structure descriptors and LSER parameters. *J Pharm Biomed Anal*, *97*, 178-183. doi: 10.1016/j.jpba.2014.04.029
- Shaikh, S. K. J., Kamble, R. R., Somagond, S. M., Devarajegowda, H. C., Dixit, S. R., & Joshi, S. D. (2017). Tetrazolylmethyl quinolines: Design, docking studies, synthesis, anticancer and antifungal analyses. *Eur J Med Chem*, *128*, 258-273. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.01.043
- Sharma, A., Jansen, R., Nimitz, M., Johri, B. N., & Wray, V. (2007). Rhamnolipids from the rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. GRP(3) that reduces damping-off disease in Chilli and tomato nurseries. *J Nat Prod*, *70*(6), 941-947. doi: 10.1021/np0700016
- Shetye, G. S., Singh, N., Jia, C., Nguyen, C. D., Wang, G., & Luk, Y. Y. (2014). Specific maltose derivatives modulate the swarming motility of nonswarming mutant and inhibit bacterial adhesion and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chembiochem*, *15*(10), 1514-1523. doi: 10.1002/cbic.201402093
- Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*, *24*(1), 71-109. doi: 10.1128/CMR.00030-10
- Smith, K. M., Bu, Y., & Suga, H. (2003a). Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem Biol*, *10*(1), 81-89.
- Smith, K. M., Bu, Y., & Suga, H. (2003b). Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chem Biol*, *10*(6), 563-571.
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F., & Deziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *68*(6), 718-725. doi: 10.1007/s00253-005-0150-3
- Sobke, A., Klinger, M., Hermann, B., Sachse, S., Nietzsche, S., Makarewicz, O., . . . Straube, E. (2012). The urinary antibiotic 5-nitro-8-hydroxyquinoline (Nitroxoline) reduces the formation and induces the dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by chelation of iron and zinc. *Antimicrob Agents Chemother*, *56*(11), 6021-6025. doi: 10.1128/AAC.01484-12
- Sodagari, M., Wang, H., Newby, B. M., & Ju, L. K. (2013). Effect of rhamnolipids on initial attachment of bacteria on glass and octadecyltrichlorosilane-modified glass. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *103*, 121-128. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.10.004

- Soukariéh, F., Vico Oton, E., Dubern, J. F., Gomes, J., Halliday, N., de Pilar Crespo, M., . . . Camara, M. (2018). In Silico and in Vitro-Guided Identification of Inhibitors of Alkylquinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, *23*(2). doi: 10.3390/molecules23020257
- Starkey, M., Lepine, F., Maura, D., Bandyopadhaya, A., Lesic, B., He, J., . . . Rahme, L. (2014). Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLoS Pathog*, *10*(8), e1004321. doi: 10.1371/journal.ppat.1004321
- Staugas, R. E., Harvey, D. P., Ferrante, A., Nandoskar, M., & Allison, A. C. (1992). Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes. *Infect Immun*, *60*(8), 3162-3168.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 1-11. doi: 10.1895/wormbook.1.101.1
- Talamas, F. X., Abbot, S. C., Anand, S., Brameld, K. A., Carter, D. S., Chen, J., . . . Weller, P. E. (2014). Discovery of N-[4-[6-tert-butyl-5-methoxy-8-(6-methoxy-2-oxo-1H-pyridin-3-yl)-3-quinolyl]phenyl]methanesulfonamide (RG7109), a potent inhibitor of the hepatitis C virus NS5B polymerase. *J Med Chem*, *57*(5), 1914-1931. doi: 10.1021/jm401329s
- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J. C., . . . Yamaguchi, K. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun*, *71*(10), 5785-5793.
- Teghanemt, A., Zhang, D., Levis, E. N., Weiss, J. P., & Gioannini, T. L. (2005). Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *J Immunol*, *175*(7), 4669-4676.
- Thomson, N. R., Crow, M. A., McGowan, S. J., Cox, A., & Salmond, G. P. (2000). Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol*, *36*(3), 539-556.
- Toder, D. S., Gambello, M. J., & Iglewski, B. H. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol Microbiol*, *5*(8), 2003-2010.
- Tuleva, B. K., Ivanov, G. R., & Christova, N. E. (2002). Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Z Naturforsch C*, *57*(3-4), 356-360.
- Turnbull, L., & Whitchurch, C. B. (2014). Motility assay: twitching motility. *Methods Mol Biol*, *1149*, 73-86. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0_9
- Usher, L. R., Lawson, R. A., Geary, I., Taylor, C. J., Bingle, C. D., Taylor, G. W., & Whyte, M. K. (2002). Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol*, *168*(4), 1861-1868.
- Valentini, M., & Filloux, A. (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J Biol Chem*, *291*(24), 12547-12555. doi: 10.1074/jbc.R115.711507
- Valot, B., Guyeux, C., Rolland, J. Y., Mazouzi, K., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2015). What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated. *PLoS One*, *10*(5), e0126468. doi: 10.1371/journal.pone.0126468

- Van Gennip, M., Christensen, L. D., Alhede, M., Phipps, R., Jensen, P. O., Christophersen, L., . . . Bjarnsholt, T. (2009). Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS*, *117*(7), 537-546. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02466.x
- Van Houdt, R., Givskov, M., & Michiels, C. W. (2007). Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev*, *31*(4), 407-424. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00071.x
- van Tilburg Bernardes, E., Charron-Mazenod, L., Reading, D. J., Reckseidler-Zenteno, S. L., & Lewenza, S. (2017). Exopolysaccharide-Repressing Small Molecules with Antibiofilm and Antivirulence Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, *61*(5). doi: 10.1128/AAC.01997-16
- Vandekerckhove, S., Tran, H. G., Desmet, T., & D'Hooghe, M. (2013). Evaluation of (4-aminobutyloxy)quinolines as a novel class of antifungal agents. *Bioorg Med Chem Lett*, *23*(16), 4641-4643. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.06.014
- Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F., & Dorey, S. (2010). Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *Int J Mol Sci*, *11*(12), 5095-5108. doi: 10.3390/ijms11125095
- Ventola, C. L. (2015a). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*, *40*(4), 277-283.
- Ventola, C. L. (2015b). The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents. *P T*, *40*(5), 344-352.
- Verma, A., Schirm, M., Arora, S. K., Thibault, P., Logan, S. M., & Ramphal, R. (2006). Glycosylation of b-Type flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*: structural and genetic basis. *J Bacteriol*, *188*(12), 4395-4403. doi: 10.1128/JB.01642-05
- Videnovic, M., Opsenica, D. M., Burnett, J. C., Gomba, L., Nuss, J. E., Selakovic, Z., . . . Solaja, B. A. (2014). Second generation steroidal 4-aminoquinolines are potent, dual-target inhibitors of the botulinum neurotoxin serotype A metalloprotease and *P. falciparum* malaria. *J Med Chem*, *57*(10), 4134-4153. doi: 10.1021/jm500033r
- Walker, G., Hertle, R., & Braun, V. (2004). Activation of *Serratia marcescens* hemolysin through a conformational change. *Infect Immun*, *72*(1), 611-614.
- Wang, S., Liu, X., Liu, H., Zhang, L., Guo, Y., Yu, S., . . . Ma, L. Z. (2015). The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep*, *7*(2), 330-340. doi: 10.1111/1758-2229.12252
- Wei, J. R., & Lai, H. C. (2006). N-acylhomoserine lactone-dependent cell-to-cell communication and social behavior in the genus *Serratia*. *Int J Med Microbiol*, *296*(2-3), 117-124. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.033
- Wei, J. R., Tsai, Y. H., Horng, Y. T., Soo, P. C., Hsieh, S. C., Hsueh, P. R., . . . Lai, H. C. (2006). A mobile quorum-sensing system in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*, *188*(4), 1518-1525. doi: 10.1128/JB.188.4.1518-1525.2006
- Welsh, M. A., Eibergen, N. R., Moore, J. D., & Blackwell, H. E. (2015). Small molecule disruption of quorum sensing cross-regulation in *pseudomonas aeruginosa* causes major and unexpected alterations to virulence phenotypes. *J Am Chem Soc*, *137*(4), 1510-1519. doi: 10.1021/ja5110798
- Westman, E. L., Mawish, J. M., & Lam, J. S. (2010). *Pseudomonas*. In C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer & C. O. Thoen (Eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (pp. 443-468): Wiley-Blackwell.

- Whiteley, M., Lee, K. M., & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(24), 13904-13909.
- Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Ahmed, R. A., Goldet, G., Slater, H., Woodley, L., . . . Salmond, G. P. (2005). Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylopyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol Microbiol*, *56*(4), 971-989. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04602.x
- Wilson, R., Sykes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W., & Cole, P. J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun*, *56*(9), 2515-2517.
- Wittgens, A., Kovacic, F., Muller, M. M., Gerlitzki, M., Santiago-Schubel, B., Hofmann, D., . . . Rosenau, F. (2017). Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl Microbiol Biotechnol*, *101*(7), 2865-2878. doi: 10.1007/s00253-016-8041-3
- Wolf, P., & Elsasser-Beile, U. (2009). *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *Int J Med Microbiol*, *299*(3), 161-176. doi: 10.1016/j.ijmm.2008.08.003
- World Health Organisation. (2017). Retrieved 3 April 2019, from <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., & Parsek, M. R. (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(13), 7907-7912. doi: 10.1073/pnas.1231792100
- Wretling, B., & Pavlovskis, O. R. (1983). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in *Pseudomonas* infections. *Rev Infect Dis*, *5 Suppl 5*, S998-1004.
- Wright, G. D. (2016). Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends Microbiol*, *24*(11), 862-871. doi: 10.1016/j.tim.2016.06.009
- Yang, L., Nilsson, M., Gjermansen, M., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2009). Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Mol Microbiol*, *74*(6), 1380-1392. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06934.x
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., . . . Williams, P. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, *70*(10), 5635-5646.
- Yeung, A. T., Torfs, E. C., Jamshidi, F., Bains, M., Wiegand, I., Hancock, R. E., & Overhage, J. (2009). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol*, *191*(18), 5592-5602. doi: 10.1128/JB.00157-09
- Yoshida, K., Nakayama, K., Yokomizo, Y., Ohtsuka, M., Takemura, M., Hoshino, K., . . . Watkins, W. J. (2006). MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 6: exploration of aromatic substituents. *Bioorg Med Chem*, *14*(24), 8506-8518. doi: 10.1016/j.bmc.2006.08.037

- Yu, V. L. (1979). *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. *N Engl J Med*, 300(16), 887-893. doi: 10.1056/NEJM197904193001604
- Zhong, H., Jiang, Y., Zeng, G., Liu, Z., Liu, L., Liu, Y., . . . He, Y. (2015). Effect of low-concentration rhamnolipid on adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *J Hazard Mater*, 285, 383-388. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.11.050
- Zolfaghar, I., Evans, D. J., & Fleiszig, S. M. (2003). Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 71(9), 5389-5393.
- Zuo, R., Garrison, A. T., Basak, A., Zhang, P., Huigens, R. W., 3rd, & Ding, Y. (2016). In vitro antifungal and antibiofilm activities of halogenated quinoline analogues against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Int J Antimicrob Agents*, 48(2), 208-211. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.04.019

Biografija

Ivana (Miroslav) Aleksic je rođena 24. Septembra 1990. godine u Beogradu, Srbija. Završila je osnovnu školu Despot Stefan Lazarević i Petu beogradsku gimnaziju u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2009 godine, a 2014. godine stekla je zvanje diplomirani biolog, potom 2015. master biolog, usmerenje mikrobiologija. Doktorske studije upisuje 2015. godine na istom Univerzitetu.

Od 2016. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, a sadašnje svanje istraživač saradnik stekla je u januaru 2019. godine.

Glavni fokus istraživačkog rada bila je potraga za strukturno novim molekulima sa anti-virulentnim dejstvom na patogene bakterije, bez uticaja na vijabilnost bakterijskih ćelija. Počevši od pretrage za jedinjenjima prirodnog porekla, pretraživanjem laboratorijske kolekcije mikroorganizama tj. testiranjem ukupnih ekstrakata sredinskih izolata, pretraga je kasnije proširena i na biljne ekstrakte, na komplekse bakra(II) i hemijskim putem sintetisane strukturne analoge prirodnih autoinducera vrste *P. aeruginosa*.

Pored angažovanja na domaćem projektu „Izučavanje mikrobiološkog diverziteta i karakterizacija korisnih sredinskih mikroorganizama” (OI 173048), a trenutno učestvuje i na međunarodnom projektu „Nove sinergističke strategije za lečenje hroničnih infekcija rana” (Collaborative Research Project 2017-2019). Član je udruženja mikrobiologa Srbije i Društva genetičara Srbije.

Iz dosadašnjeg naučno istraživačkog rada Ivane Aleksic proizašle su sledeće publikacije, šest radova u međunarodnim časopisima i to tri rada u časopisu kategorije M21, dva rada u časopisima kategorije M22 i jedan rad u časopisu kategorije M23.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Алексић

број индекса Б3009/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Деривати рамнолипида и 4-аминохинолина као инхибитори вируленције код врста
Pseudomonas aeruginosa и *Serratia marcescens***

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 20.08.2019.

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора	Ивана Алексић
Број индекса	Б3009/2015
Студијски програм	Биологија
Наслов рада	Деривати рамнолипида и 4-аминохинолина као инхибитори вируленције код врста <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Serratia marcescens</i>
Ментор	др Славиша Станковић, редовни професор др Лидија Шенеровић, виши научни сарадник

Потписана Ивана Алексић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 20.08.2019.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Деривати рамнолипида и 4-аминохинолина као инхибитори вируленције код врста
Pseudomonas aeruginosa и *Serratia marcescens***

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 20.08.2019.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.