

Slika 4. Sinteza azitromicina iz eritromicina

2.1.3. Mehanizam djelovanja makrolida

Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika temelji se na vezanju za ribosom i blokiranju sinteze bakterijskih proteina. Imaju širok spektar aktivnosti zbog velikog afiniteta prema bakterijskim ribosomima.

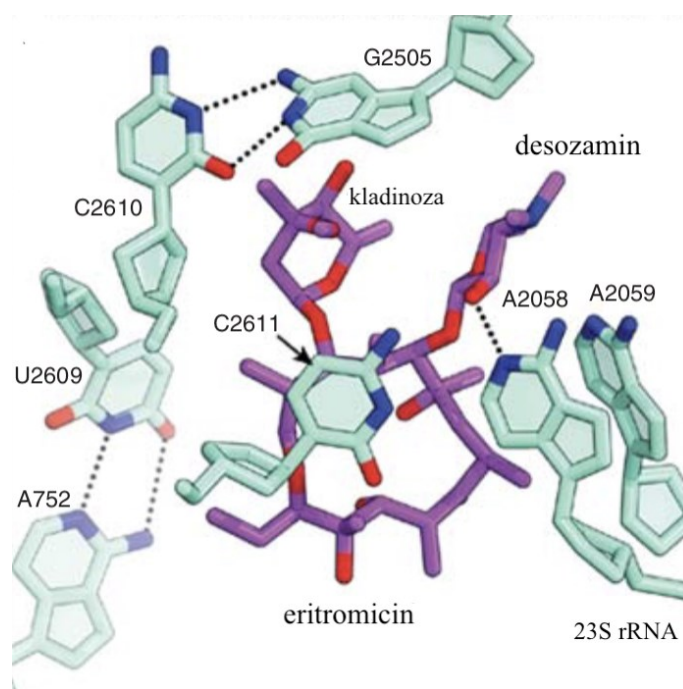
Bakterijski ribosom (70S) sastoji se od male (30S) i velike podjedinice (50S). Mala podjedinica je građena od 16S rRNA, a velika se podjedinica sastoji od dvije molekule rRNA - 23S i 5S. U maloj podjedinici genetski kod se prevodi u niz aminokiselina, a uloga velike je sinteza peptidne veze.⁸

Makrolidi se reverzibilno vežu na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma i interagiraju s 23S RNA u regiji peptidil transferaze. Vežu se na početku izlaznog tunela za proteine te tako dolazi do blokiranja produljenja polipeptidnog lanca te inhibiranja sinteze proteina.¹

Veći makrolidi, kao što su 16-eročlani makrolidi, sterički blokiraju lumen tunela. Utvrđeno je da blokiraju aktivnost peptidiltransferaze i onemogućuju sintezu peptidne veze vezanjem na mjesto A i blokiranjem vezanja aminoacil-tRNA.

Međutim, 14-eročlani makrolidi, poput eritromicina, ne blokiraju aktivnost peptidiltransferaze, nego se vežu na početak izlaznog tunela za peptide i sterički ga blokiraju. Peptidil-tRNA zatim disocira s ribosoma.¹⁰

Makrolidi se vežu za ribosom pomoću laktonskog prstena i šećera vezanog na C5-atomu. Između makrolida i ribosoma uspostavljaju se vodikove veze. Šećer (desozamin) stvara vodikove veze s nukleotidnim bazama ribosoma u peptidil transferaznom centru. 2'-OH-skupina desozamina tvori vodikove veze s nukleotidnim bazama na položaju A2058 i A2059. Ukoliko dođe do metilacije amino skupine A2058 onemogućuje se formiranje vodikove veze s hidroksilnom skupinom desozamina te to dovodi do rezistencije na makrolide. Kladinoza ne sudjeluje u interakciji s 23S rRNA.^{3,10,13}



Slika 5. H-veze između 2'-OH desozamina eritromicina i nukleotidne baze N1 A2058¹³

2.1.4. Mehanizam rezistencije bakterija

Otpornost na eritromicin prvi put je viđena iste godine kada je eritromicin uveden u kliničku upotrebu. Otpornost se također razvila u većini drugih organizama protiv kojih su eritromicin i drugi makrolidi korišteni. Geni koji su odgovorni za otpornost nađeni su kod svih Gram-pozitivnih bakterija za koje je eritromicin korišten. Nalaze se na plazmidima i transpozonima i lako se prenose između sojeva i vrsta.⁸

Glavni mehanizmi rezistencije kod bakterija na makrolide su:

- modifikacija ribosomske mete
- izbacivanje makrolida iz bakterijske stanice (efluks)
- prevođenje antibiotika u neaktivan oblik
- mutacije u 23S rRNA i ribosomskim proteinima L4 i L22^{8,10}

Gram-pozitivne bakterije mogu steći gen koji daje visoku razinu otpornosti na makrolide. Bakterije s *erm* genom su otporne na eritromicin. Tijekom sinteze proteina dolazi do ekspresije *erm* gena i nastanka enzima koji metilira rRNA. Stvara se enzim adenil-*N*-metiltransferaza koja metilira nukleotide u 23S rRNA u 50S čime se mijenja struktura veznog mjesta pa se makrolidi više ne mogu vezati ili velike metilne skupine izravno ometaju vezanje. Enzimi metiliraju adenin, što rezultira stvaranjem *N*-metil adenina ili *N,N*-dimetil adenina i posttranskripcijskom modifikacijom strukture 23S rRNA. Tako promijenjena 50S podjedinica smanjuje afinitet prema vezanju makrolida koji onda ne može inhibirati sintezu proteina.

Erm rezistencija može postojati u dva oblika: inducibilni i konstitutivni. Kod inducibilne rezistencije metilacija ribosoma se razvija tek nakon što se makrolid uđe u stanice. U konstitutivnom obliku enzim je aktivan i ako nema makrolida. I inducibilna i konstitutivna rezistencija na MLS_B zahtijevaju intaktnu kodirajuću sekvencu *erm* gena.^{8,14,15}

Drugi mehanizam rezistencije se temelji na uklanjanju antibiotika iz bakterijskih stanica tzv. efluks mehanizmom. MefA su skupine transportnih proteina kodiranih genom *mefA* koji uzrokuju izbacivanje antibiotika van stanice. Posjeduju vezno mjesto za makrolidne antibiotike. Nastaju konformacijske promjene u proteinu kako bi se izbacio makrolid u zamjenu za proton. Geni *mef* uglavnom se nalaze kod Gram-pozitivnih bakterija, ali su zabilježeni i kod Gram-negativnih bakterija. MefA daje otpornost na 14-eročlane i 15-eročlane makrolide, ali ne i na 16-eročlane makrolide.^{7,8,13}

Treći mehanizam rezistencije bakterija je prevođenje antibiotika u neaktivni oblik pomoću enzima. Makrolidne fosfotransferaze su enzimi koji inaktiviraju makrolide tako što prenose fosfat od ATP-a na 2'-OH grupu eritromicina. Ovi unutarstanični enzimi su pronađeni u *E.coli*. Mph(A) fosforilira 14- i 15-eročle prstene, dok su supstrati za Mph(B) 14- i 16-eročlani makrolidi. Prijenosom γ -fosfata na 2'-OH skupinu makrolidnih antibiotika prekida se ključna

interakcija makrolida s A2058. Mph enzimi osim ATP-a, mogu koristiti i GTP. Ekspresija *mph(A)* je inducirana eritromicinom. Utvrđeno je da Mph(A) daje otpornost na eritromicin, telitromicin, azitromicin i spiramicin. Enzimi Mph(B) i Mph(C) dali su otpornost na eritromicin, spiramicin i telitromicin, ali nije primijećena aktivnost na azitromicin.^{7,13}

Inaktivacija antibiotika može se provoditi i pomoću makrolidnih esteraza. Temelji se na hidrolitičkoj inaktivaciji makrolida esterazama čiji su supstrati 14- i 15-eročlani makrolidi. Geni *ereA* i *ereB* slabo su povezani, a svaki daje otpornost na eritromicin u *E. coli*. Ere(A) je esteraza tipa I, a Ere(B) esteraza tipa II te obje hidroliziraju laktonski prsten.^{7,13}

2.2. Makrolidi i biološke mete

Makrolidni antibiotici predstavljaju klinički važnu klasu antibiotika koji blokiraju sintezu proteina interagirajući s velikom ribosomskom podjedinicom 50S. Makrolidi tvore interakcije s ribosomima, proteinima, bakterijskim membranama i žučnim kiselinama. Stoga je potrebno istražiti interakcije makrolida s biološkim metama kako bi se bolje razumjela bioaktivnost makrolida i uspješno dizajnirali novi bioaktivni derivati.

2.2.1. Interakcije makrolida i ribosoma

Makrolidni antibiotici s 14- do 16-eročlanim aglikonskim prstenima blokiraju različite faze translacije. To može biti nastajanje prve, druge ili treće peptidne veze. Zbog svoje složene strukture, makrolidi mogu imati razne konformacije. Sposobnost vezanja makrozona za ribosome ovisi o prostornoj orijentiranosti. Položaj makrocikličkog prstena u odnosu na lumen tunela i proteinske podjedinice L4, L22 i L37E utječu na sposobnost vezanja za tunel bakterijskog ribosoma.¹⁶ Njihove fizikalno-kemijske karakteristike također mogu biti drugačije. Istraživanja su pokazala da 14-eročlani i 15-eročlani makrolidi imaju sličan način vezanja za ribosom.^{10,16}

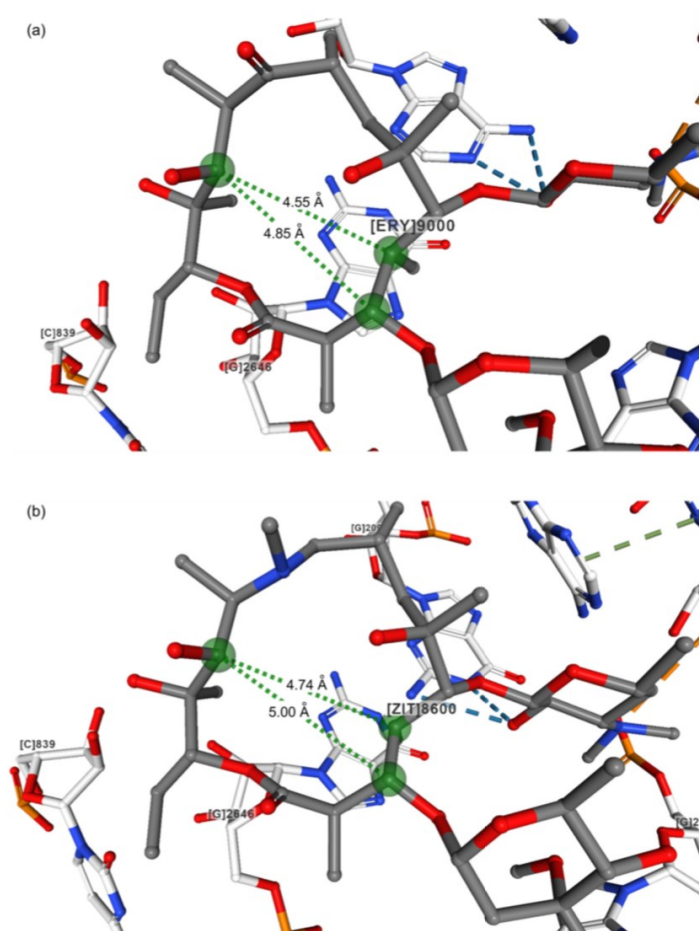
Pokazano je da 14-eročlani i 15-eročlani makrolidi mogu postojati u dvije konformacije, savijenoj (*folded-in*) i izvrnutoj (*folded-out*). Navedene konformacije se odnose na izvijanje fragmenta C3-C5 prema van i prema unutra. Konformacije se razlikuju u udaljenosti nekih atoma koja je pri izvrnutoj konformaciji kraća, a kod savijene dulja i obrnuto.^{1,10}

Kristalne strukture makrolida i ribosoma upućuju da je vezna konformacija *folded-out*, gdje je jedna strana hidrofobna, a polarne skupine laktonskog prstena usmjerene su prema

drugoj strani molekule. Prilikom vezanja za ribosom, polarne skupine su u blizini lumena izlaznog tunela za proteine, a hidrofobni je dio okrenut prema stijenci tunela.¹

15-eročlani makrolidi imaju veću konformacijsku fleksibilnost od 14-eročlanih te mogu postojati i u *3-endo-folded-out*, tj. prijelaznoj konformaciji između *folded-out* i *folded-in*.

Utvrđeno je da je vezna konformacija makrolida slična onoj u slobodnom stanju. Pomoću tehnike NMR otkriveno je da u otopini prevladava izvrnuta odnosno konformacija *folded-out*. Savijena konformacija *folded-in* također može biti prisutna ovisno o polarnosti otapala.¹⁰



Slika 6. Kristalne strukture: a) eritromicina i b) azitromicina, vezanih za 50 S podjedinicu ribosoma bakterije *H. marismortui*³

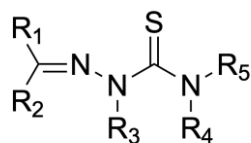
2.2.2. Interakcije makrolida i albumina

Visoka akumulacija u stanicama jedna je od najvažnijih razloga za uspješno djelovanje antibiotika. Albumini su skupina proteina koji se nalaze u krvnoj plazmi. Oni se reverzibilno vežu za lijekove i stoga mogu služiti za transport makrolidnih antibiotika. Vežanje na proteine plazme ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima makrolida kao što su topljivost, propusnost i bioraspoloživost.^{1,10}

Tehnika STD NMR korištena je za određivanje epitopa vezanja azitromicina, oleandomicina i telitromicina. Kao modelni sustav za proučavanje interakcija poslužio je goveđi serumski albumin (BSA). Novak i suradnici utvrdili su da azitromicin i oleandomicin slično interagiraju za BSA.¹⁰ Kod telitromicina uočeno je drugačije vežanje što proizlazi od drugih strukturnih jedinica u blizini BSA. Desozaminska podjedinica telitromicina nalazi se udaljenije prilikom interakcije s BSA. Kod azitromicina i oleandomicina desozamin je u puno bližem kontaktu s BSA. Telitromicin za razliku od azitromicina i oleandomicina ne sadrži kladinozu, a sadrži alkil-heteroarilni bočni lanac što značajno utječe na vežanje.^{1,10}

2.3. Tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazoni su organosumporni spojevi opće formule $H_2N-C(S)-NH-N=CR_2$. Amino skupine mogu biti supstituirane organskim skupinama. Tiosemikarbazoni, njihovi derivati i kompleksi, pokazuju široki spektar bioloških učinaka, kao što su antitumorsko, antivirusno, antifungalno i antibakterijsko djelovanje.^{1,17,18}

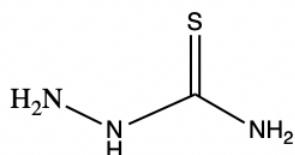


Slika 7. Struktura tiosemikarbazona

Tiosemikarbazid je važan prekursor koji se koristi u sintezi mnogih polidentatnih liganada. Reaktivnost njegovih dviju terminalnih amino skupina se razlikuje. Tioamidna skupina slabo reagira s karbonilnim spojevima, dok je amino skupina reaktivnija i lako se kondenzira s 2-hidroksi/amino supstituiranim karbonilnim spojevima u obliku Schiffovih baza.

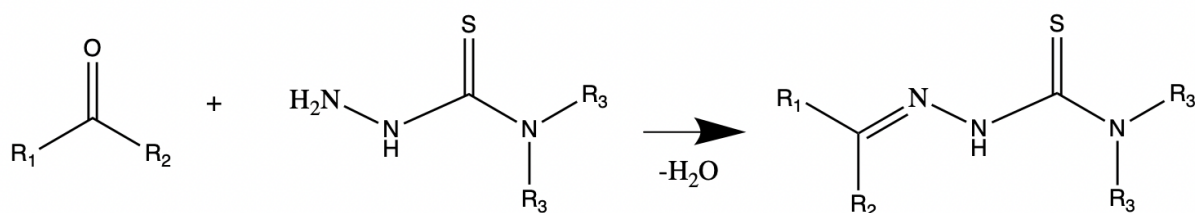
Reakcijom kondenzacije s karbonilnim spojem u prisutnosti iona prijelaznih metala dobiju se kompleksi tiosemikarbazon-metal.¹⁹

Neki konjugati tiosemikarbazida ometaju mehanizme efluksne pumpe kod rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* i mogu poslužiti kao antimikrobni agensi.¹



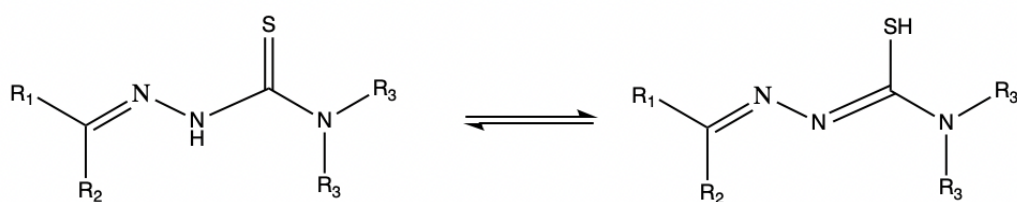
Slika 8. Struktura tiosemikarbazida

Sinteza tiosemikarbazona provodi se korištenjem supstituiranog hidrazin-hidrata i prekursora izotiocijanata. Tiosemikarbazoni se proizvode kondenzacijom tiosemikarbazida s aldehidom ili ketonom.²⁰



Slika 9. Reakcija dobivanja tiosemikarbazona

Moguća su dva konfiguracijska izomera *E* i *Z* koji se mogu koordinirati na prijelazne metale preko svojih donorskih atoma dušika i sumpora.²⁰ Tiosemikarbazoni se koordiniraju kao neutralni ligand (keto oblik ili tionski) ili kao deprotonirani anionski ligand (enolni oblik ili tiolni) kako bi stvorili stabilan peteročlani kelatni prsten ili napetiji četveročlani prsten.²¹



Slika 10. Keto/tionska i enol/tiolna tautomerija tiosemikarbazona

2.3.1. Biološko djelovanje tiosemikarbazona

Tiosemikarbazoni mogu stvarati koordinacijske spojeve s različitim prijelaznim metalima kao što su Cu, Pd i Ni. Biološke aktivnosti tiosemikarbazona posljedica su njihove sposobnosti stvaranja kelata s metalima. To se pripisuje prisutnosti elektron donorskih skupina (NH, C=S) i hidrofobnih arilnih supstituenata. Metalni kompleksi tiosemikarbazona daleko su biološki aktivniji od nekoordiniranih tiosemikarbazona. Stvaranjem kompleksa s metalima dolazi do promjene lipofilnosti, koja kontrolira brzinu ulaska agensa u stanicu.¹⁷

Tiosemikarbazoni pokazuju potencijal kao lijekovi protiv raka. Prisutnost elektron donorskih atoma N i S omogućuje nastajanje koordinacijskih spojeva s metalima, što je odgovorno za njihovu antiproliferativnu aktivnost.¹⁸

Uočeno je da kompleksiranje tiosemikarbazona s niklovim(II) ionom povećava inhibicijsko djelovanje na proliferaciju stanica.²² Istraživanja su pokazala da djeluju kao inhibitori ribonukleotid reduktaze. Ribonukleotid reduktaza je enzim koji katalizira stvaranje deoksiribonukleotida iz ribonukleotida tijekom sinteze DNA.^{20,23} Također je pokazano da tiosemikarbazoni djeluju kao inhibitori topoizomerase II, enzima koji uklanja superzavoje prilikom odmotavanja DNA.²³

2.4. Spektroskopija NMR

Spektroskopija NMR koristi se za određivanje strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula. Spektroskopijom NMR mogu se proučavati jezgre koje posjeduju spin različit od nule kao što su ¹H, ¹³C, ³¹P, ¹⁹F, ¹⁵N.²⁵

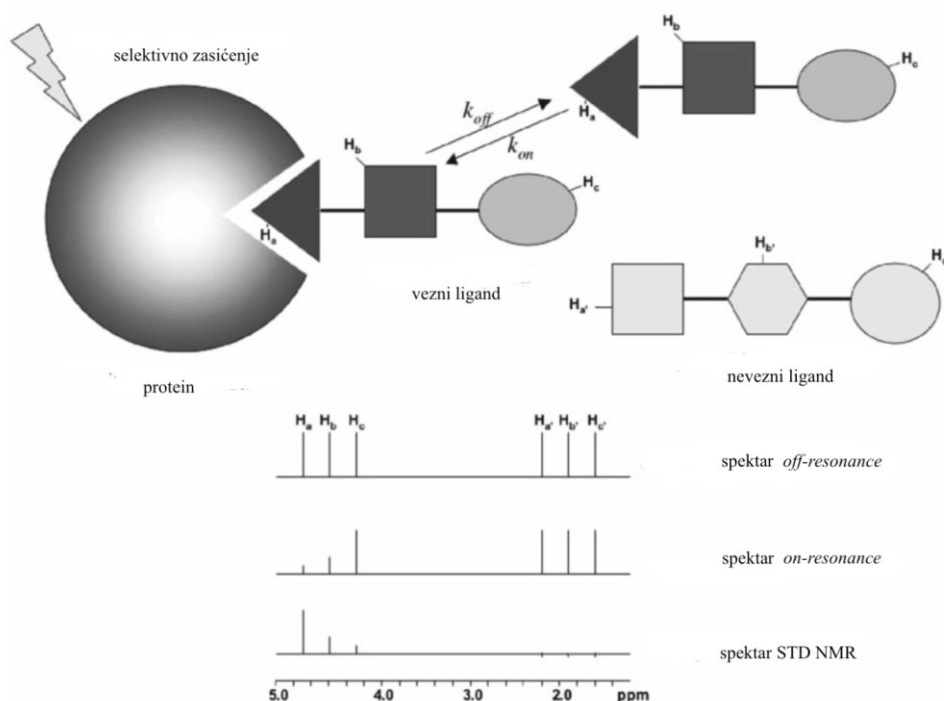
2.4.1. STD NMR

Tehnika STD NMR (*saturation transfer difference*) temelji se na nuklearnom Overhauserovom efektu (NOE) i na selektivnom zasićenju protona receptora i prijenosu magnetizacije s receptora na vezani ligand. Magnetizacija se brzo prenosi kroz cijeli protein zbog spinske difuzije. Tehnika STD NMR može se primijeniti za ligande koji se slabo do umjereno vežu na receptor te u slučaju brze izmjene između vezanog i slobodnog liganda.

U tehnici STD NMR bilježe se dva spektra, spektar *on-resonance* i spektar *off-resonance*. Spektar *on-resonance* dobiva se selektivnim radiofrekvencijskim (RF) pulsevima primijenjenim na receptor. Zasićenje s receptora prenosi se na ligand kada se on nalazi u veznom mjestu proteina. Protoni liganda koji su u najbližem kontaktu s protonima proteina ($<5\text{\AA}$) primaju najveće zasićenje što rezultira smanjenim intenzitetom u spektru *on-resonance*. Protoni koji su udaljeniji od proteina primaju malo ili ne primaju zasićenje.

U otopini mogu biti prisutni i slobodni ligandi, ali budući da se ne vežu na receptor neće primiti nikakav prijenos zasićenja od proteina pa neće biti prigušeni u spektru *on-resonance*.

Spektar *off-resonance* predstavlja uobičajen spektar ^1H NMR. Oduzimanjem rezonantnog od nerezonantnog spektra dobiva se spektar STD NMR koji otkriva one fragmente koji se vežu na protein. Spektar STD NMR može detektirati samo protone liganda koji su u bliskom kontaktu s mjestom vezanja proteina. Protoni liganda koji su prostorno najbliže protonima proteina daju najjači signal u spektru STD-NMR, dok oni udaljeniji imaju slabije signale. Signali nevezanih liganada bit će jednakog intenziteta u *on-resonance* i *off-resonance* spektru, te se nakon oduzimanja neće pojaviti nikakvi signali u spektru razlike. Pomoću tehnike STD NMR mogu se identificirati samo ligandi koji imaju afinitet vezanja.^{4,6,26,27}

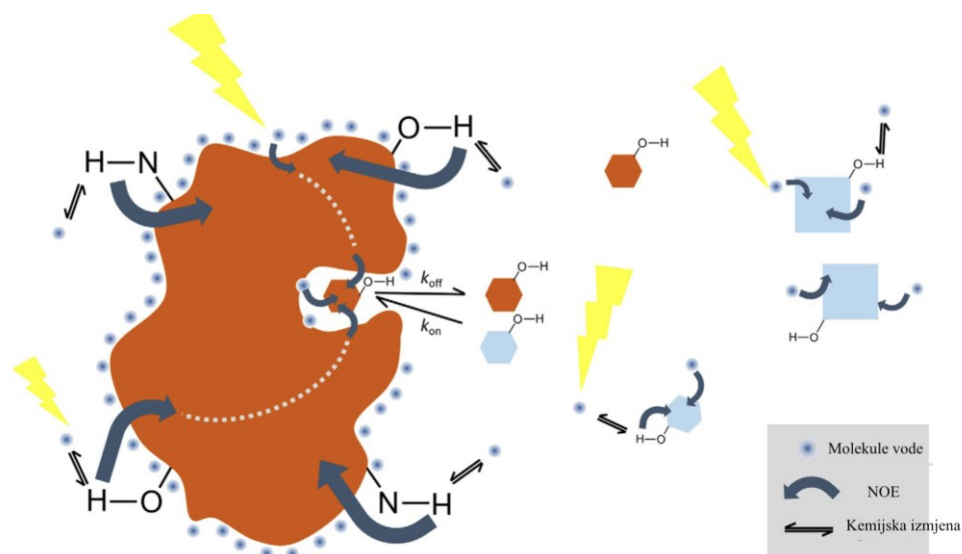
Slika 11. Prikaz tehnike STD NMR²⁶

Stupanj zasićenosti protona liganda ovisi o njegovoj prostornoj udaljenosti od proteina i može se iskoristiti za određivanje dijelova liganda koji se vežu za aktivno mjesto proteina. Moguće je razlikovati atome koji sudjeluju u vezanju i one koji ne sudjeluju u vezanju.

Tehnika STD NMR zahtijeva relativno malu količinu proteina. Ostale prednosti tehnike STD NMR su jednostavnost primjene i manja vjerojatnost lažno pozitivnih signala u usporedbi s drugim tehnikama. Moguće ju je primijeniti na proteine velike molekulske mase. Nedostaci tehnike STD NMR su manja osjetljivost i dugo vrijeme eksperimenta. Također, ligandi koji imaju veliki afinitet vezanja odnosno nalaze se u režimu spore izmjene ostaju dulje unutar mjesta vezanja proteina i stoga se ne mogu detektirati spektroskopijom STD NMR.^{26,27}

2.4.2. WaterLOGSY NMR

WaterLOGSY je tehnika NMR koja se koristi za proučavanje interakcija liganda i proteina. To je varijacija tehnike STD NMR koja se temelji na činjenici da će NOE biti negativan samo kada je ligand vezan na protein. Magnetizacija se prenosi s vode na protein i onda na ligand.



Slika 12. Putevi prijenosa magnetizacije između vode, proteina i liganda²⁸

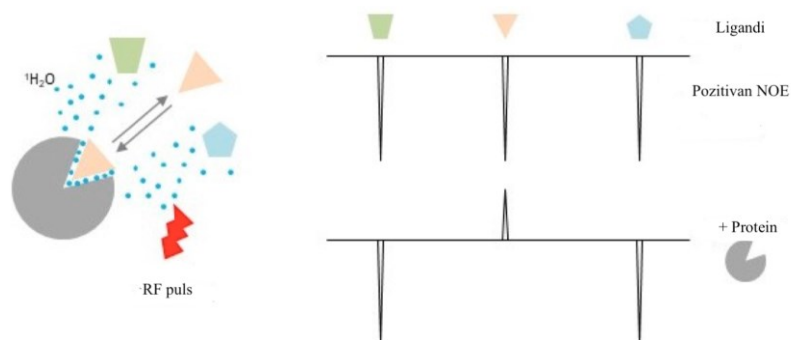
U promatranom sustavu ligand-receptor voda može postojati kao slobodna voda i kao voda koja okružuje proteine i male molekule pa selektivnom pobudom velike količine vode dolazi do prijenosa magnetizacije na sve molekule koje su prisutne u otopini putem NOE. Magnetizacija se također može prenijeti s površine proteina na njegovu unutrašnjost kroz spinsku difuziju, a zatim na ligande preko NOE. Prijenos magnetizacije se može postići i kemijskom izmjenom između vode i izmjenjivih protona na proteinima (NH₂, OH).^{5,6,29}

U eksperimentu se određuje NOE između vode i liganda. NOE za vezanu vodu ima suprotan predznak od onog iz slobodne vode. Vezni i slobodni ligandi imaju suprotne predznake pa se mogu razlikovati u spektru WaterLOGSY.

Snimaju se dva spektra od kojih je jedan referentni spektar koji sadrži samo male molekule i drugi spektar koji uključuje i male molekule i makromolekule. U referentnom spektru svi signali bi trebali biti negativni osim izmjenjivih protona koji se zbog kemijske izmjene s vodom pojavljuju kao pozitivni signali.

Predznaci signala NOE između malih i velikih molekula su različiti. Male se molekule u otopini gibaju relativno brzo, a velike molekule sporo. Zbog toga male molekule pokazuju pozitivne signale NOE, a velike molekule negativne signale NOE. Male molekule koje se ne vežu za proteine će dati pozitivne signale NOE s vodom tj. imat će negativan signal WaterLOGSY. Proteini će pokazivati negativne signale NOE tj. pozitivan signal WaterLOGSY.

Ligandi koji su u brzom izmjeni između slobodnog i vezanog stanja mogu se pojaviti kao negativni signali NOE ako su vezani za proteine ili mogu dati pozitivne signale NOE s vodom ako su slobodni ligandi. Signal liganda koji se veže mijenja predznak zbog interakcije s proteinom.^{5,6,28-31}



Slika 13. Prikaz tehnike WaterLOGSY³⁰

WaterLOGSY je osjetljivija tehnika od STD NMR. Osim za identifikaciju proteinskih liganada koristi se i za određivanje konstanti vezanja protein-ligand. Dobra je tehnika za receptore niske gustoće protona kao što su nukleinske kiseline.⁶

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i instrumenti

- Azitromicin, *Fidelta d.o.o.*, Hrvatska
- DMSO-d₆
- Fosfatni pufer pH 7,4
- Natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7.0
- Ribosom, pH = 7,4, Dr. Kalju Vanatalu, CDN Ltd., Leete 13, 11313 Tallinn, Estonija
- BSA, Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka

Tablica 1. Popis instrumenata korištenih za analizu spojeva

Instrument	Metoda
Rotovapor Buchi R-100	Uparavanje
Mettler AT261 DeltaRange	Vaganje
Bruker Avance III HD 400 MHz	Spektroskopija NMR
Bruker Avance NEO 600 MHz	

3.2. Snimanje spektara NMR

Spojevi su okarakterizirani spektroskopijom NMR, a snimljeni spektri obrađeni su i analizirani pomoću programa *Top spin* 4.2.0. Tehnike NMR koje su korištene bile su STD (*Saturation Transfer Difference*) i WaterLOGSY (*Ligand Observed via Gradient Spectroscopy*).

Snimljeni su spektri NMR benzil-4"-makrozona i njegovog kompleksa s niklom(II), M4"-NiP6. Nakon toga, snimljeni su spektri navedenih spojeva u interakciji s ribosomom izoliranog iz *E. coli* te s goveđim albuminom BSA. Kao referentni signal korišten je tetrametilsilan (TMS).

Tehnika STD NMR je korištena za određivanje epitopa vezanja. Derivat azitromicina 4"-6 (2 mg) otopljen je u 450 μL DMSO- d_6 ($v:v = 1:1$) te je dodano 450 μL deuteriranog fosfatnog pufera (pH 7,4). Nakon toga je dodan deuterirani ribosom bakterije *E. Coli* ($c_0=7,87 \mu\text{mol L}^{-1}$) u fosfatnom puferu. Omjer spoja i ribosoma bio je 3500:1.

Za proučavanje interakcije s BSA, spoj 4"-6 je otopljen u 450 μL DMSO i 450 μL fosfatnog pufera. Dodan je BSA ($c_0=1 \text{ mmol L}^{-1}$) tako da je omjer spoja i BSA 500:1.

Vrijeme zasićenja bilo je 2 s. Spektri su dobiveni spektralnom širinom od 9 kHz, i korištenjem 1024 ponavljanja. Selektivno zasićenje ribosoma provedeno je pomoću 50 ms Gauss 1.1000 pulsa. Pri snimanju spektra *on resonance* frekvencije zasićenja iznosile su 8 ppm, 10 ppm, ili -0,5 ppm, a frekvencija *off resonance* bila je na 50 ppm. Spektri STD su normalizirani postavljanjem najvećeg signala na 100 % ekvivalentnog signala ^1H NMR. Oduzimanjem spektara *on-resonance* i *off-resonance* dobije se spektar razlike.

Za tehniku WaterLOGSY uzorak 4"-6 (2 mg) je otopljen u 50 μL 10% DMSO- d_6 i kakodilatnom pufer ($V= 530 \mu\text{L}$). Za svaki uzorak snimljena su tri spektra prije i nakon dodatka ribosoma *E. Coli* tj. BSA.

Svaki spektar je dobiven s 512 skeniranja i sa spektralnom širinom od 9 kHz. Spektri su snimani pri različitim vremenima miješanja koja su iznosila 0,25 s, 0,75 s i 1,7 s.

Isti je postupak ponavljen sa kompleksom makrozona s niklom(II), M4"-NiP6 otopljenog u DMSO i deuteriranom fosfatnom puferu odnosno kakodilatnom puferu u interakciji s ribosomom iz *E. Coli* i s BSA.

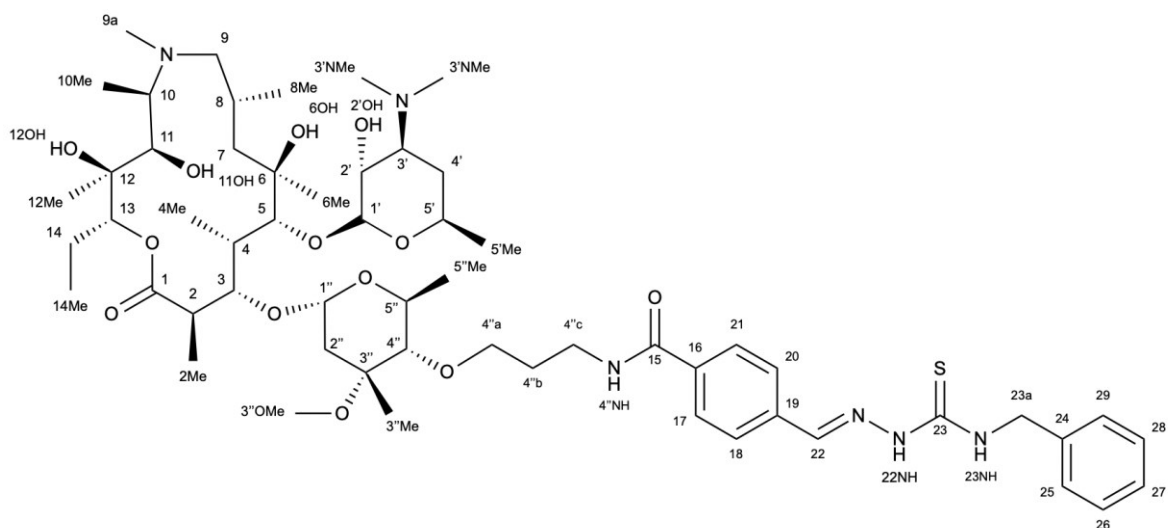
Prije snimanja spektara STD NMR i WaterLOGSY prvo je snimljen spektar ^1H NMR. Spektri STD i WaterLOGSY su snimani prije i nakon dodatka ribosoma *E. Coli*, odnosno BSA.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

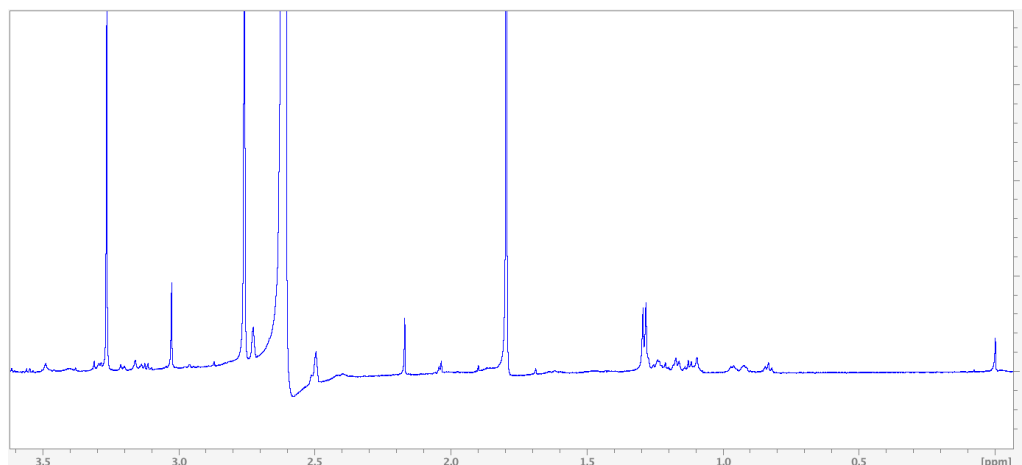
4.1. Karakterizacija 4''-benzil-makrozona

U sklopu ovog diplomskog rada nije provedena sinteza 4''-benzilnog derivata azitromicina, već je korišten prethodno sintetiziran produkt. Na slici 14 prikazana je struktura 4''-benzil-makrozona koja se sastoji od azitromicina koji na položaju 4'' preko kisika ima vezan tiosemikarbazon. Vezanje 4''-benzil-makrozona na biološke mete određeno je pomoću tehnika STD NMR i WaterLOGSY NMR.

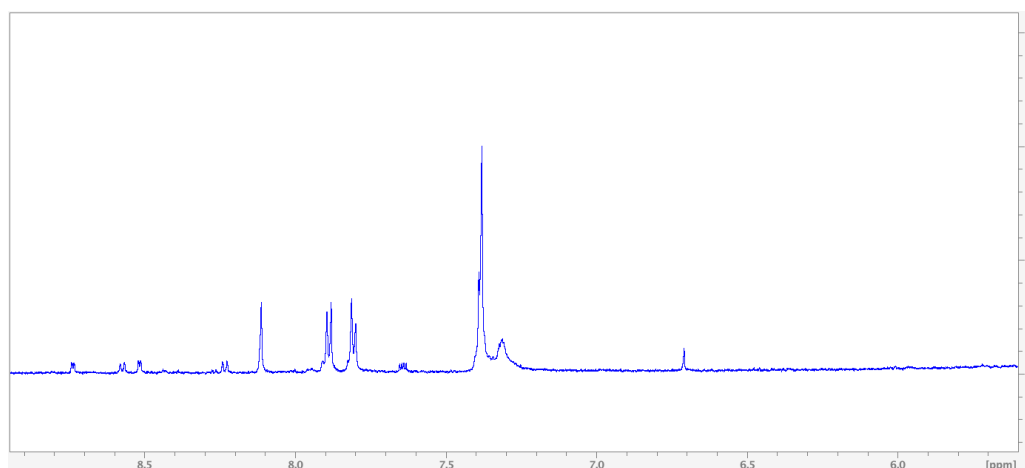
Snimljen je spektar ^1H NMR spoja u deuteriranom otapalu DMSO i fosfatnom puferu (slike 15 i 16). Spektar ^1H NMR navedenog spoja je asigniran i vrijednosti kemijskih pomaka se nalaze u tablici 2. Kemijski pomaci nekih atoma se nisu mogli asignirati zbog preklapanja signala ili zbog nemogućnosti detekcije signala. Pri 4,8 ppm prisutan je intenzivan signal koji odgovara vodi pa je spektar podijeljen u dva uvećana dijela.



Slika 14. Struktura 4''-benzil-makrozona s označenim atomima



Slika 15. Uvećani spektar ^1H NMR spoja 4''-6 prije dodatka ribosoma iz *E. coli* u fosfatnom puferu i DMSO-d_6 pri 298 K



Slika 16. Uvećani spektar ^1H NMR spoja 4''-6 prije dodatka ribosoma iz *E. coli* u fosfatnom puferu i DMSO-d_6 pri 298 K

Tablica 2. Asignacija kemijskih pomaka ^1H spoja 4''-6 u fosfatnom puferu

atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$
2	2,73	22NH	8,41
2Me	1,21	23a	4,87
3	4,08	23NH	8,74
4	2,04	25, 29	7,38
4Me	1,17	26, 28	7,39

5	3,55	27	7,31
6Me	1,28	1'	4,32
6OH	-	2'	3,12
7	-	2'OH	4,87
8	2,03	3'	-
8Me	0,94	3'NMe	2,61
9	2,50	4'	-
9a	2,76	5'	3,73
10	2,51	5'Me	1,25
10Me	1,09	1''	-
11	3,63	2''	2,17
11OH	-	3''Me	1,24
12Me	1,09	3''OMe	3,26
12OH	3,03	4''	3,55
13	-	4''a	3,29
14	-	4''b	1,69
14Me	0,83	4''c	-
17, 21	7,89	4''NH	8,57
18, 20	7,81	5''	-
22	8,11	5''Me	1,24

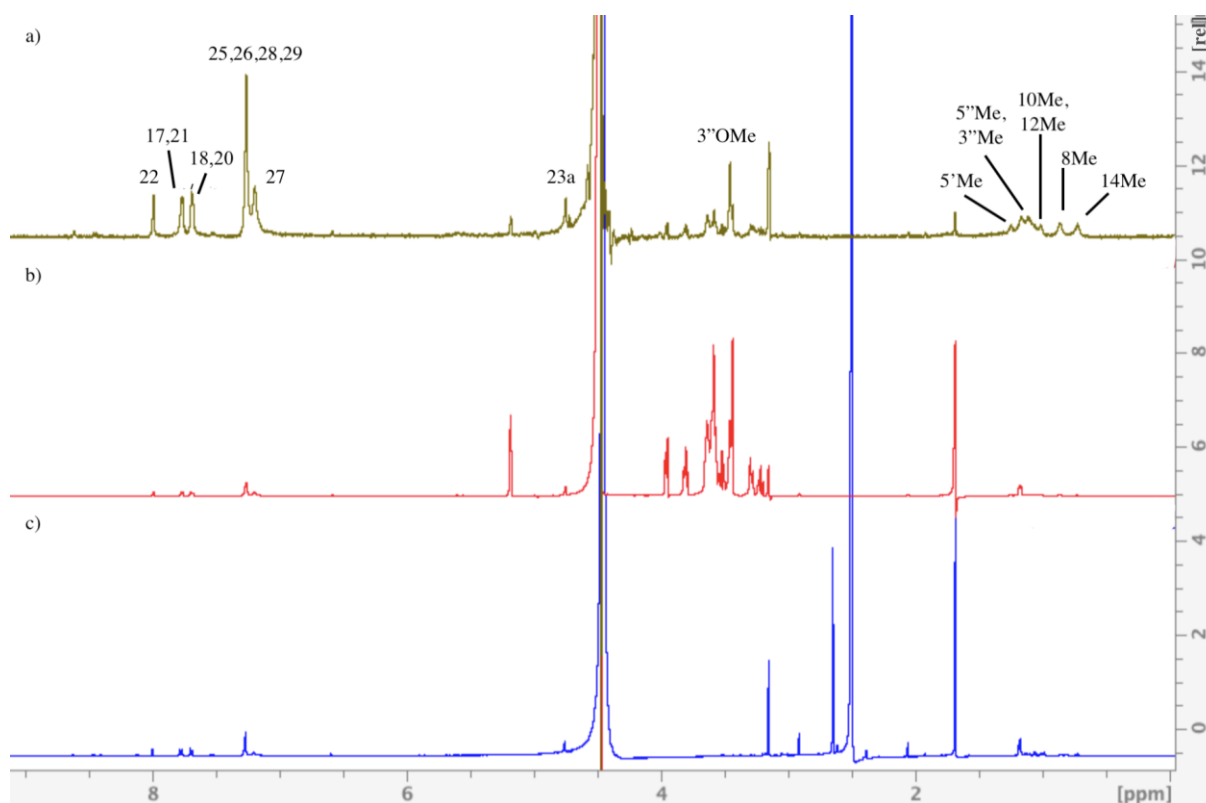
-signal nije detektiran

Tehnika STD se temelji na selektivnom zasićenju rezonancija receptora i prijenosu zasićenja na vezani ligand mehanizmom spinske difuzije. Moguće je identificirati vezne epitope liganda. Spektar razlike STD nastaje oduzimanjem dva spektra, spektra *on-resonance* i spektra *off-resonance*. Spektar razlike STD pokazuje samo signale atoma koji primaju zasićenje nakon vezanja liganda.³

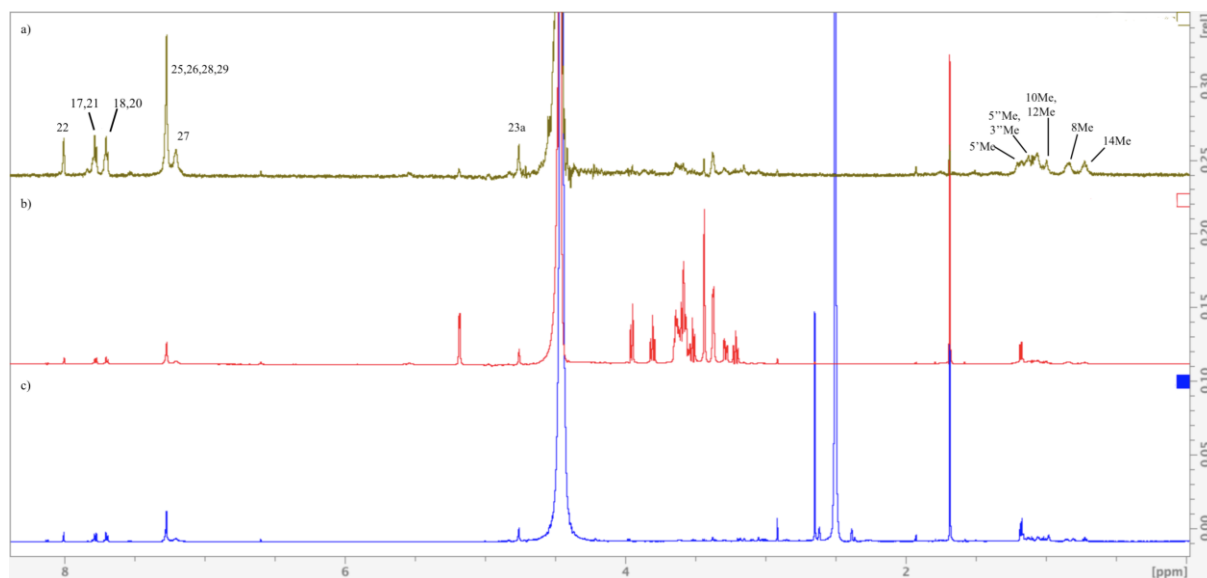
Atomi koji su prostorno najbliže ribosomu primaju najveći iznos magnetizacije i imaju najveće pojačanje intenziteta u spektru STD. Skupine makrozona koje su u bliskom kontaktu s ribosomom određene su pomoću tehnike STD NMR. U ovoj tehnici korišten je deuterirani

ribosom u fosfatnom puferu. U spektrima STD nisu prisutni signali amino skupina ($4''\text{NH}$ i 23NH) budući da se ti protoni izmjenjuju s deuterijem iz otapala.

Na slikama 17 i 18 prikazana je usporedba spektra ^1H NMR makrozona $4''\text{-}6$ prije dodatka ribosoma i spektra razlike STD pri frekvenciji *on-resonance* pri 10 ppm te 8 ppm. Bolje razlučivanje signala postignuto je pri frekvenciji od 8 ppm. Označeni su atomi koji se nalaze blizu ribosoma, a signali najvećeg intenziteta u spektru razlike STD pripadaju atomima vodika koji su najbliže receptoru te oni sudjeluju u interakciji s ribosomom.

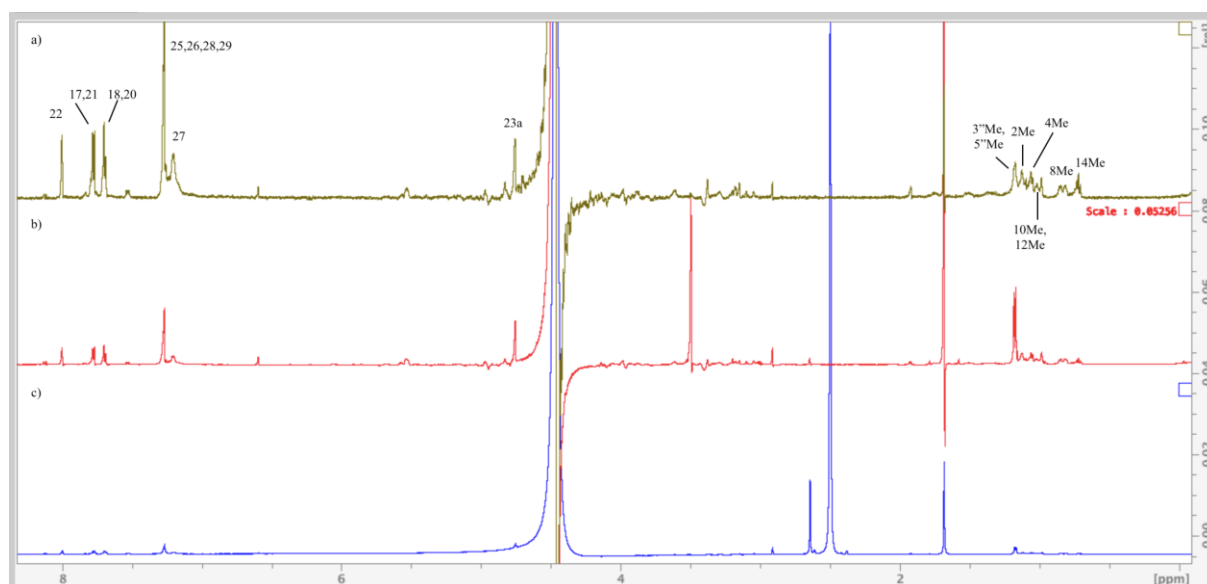


Slika 17. a) Spektar razlike STD spoja $4''\text{-}6$ nakon dodatka ribosoma pri 10 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka ribosoma i c) spektar ^1H NMR prije dodatka ribosoma



Slika 18. a) Spektar razlike STD spoja 4''-6 nakon dodatka ribosoma pri 8 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka ribosoma i c) spektar ^1H NMR prije dodatka ribosoma

Slični rezultati dobiveni su i u interakciji makrozona 4''-6 s BSA. Aromatski dio spektra pri 8-7 ppm je skoro isti kao i u interakciji s ribosomom, a spektri se razlikuju u području oko 1 ppm.



Slika 19. a) Spektar razlike STD spoja 4''-6 nakon dodatka BSA pri 10 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka BSA i c) spektar ^1H NMR prije dodatka BSA

Najintenzivniji signali u spektru STD spoja 4"-6 pripadaju protonima desozamina (5"Me), aglikonskog prstena (2Me, 4Me, 8Me, 10Me, 12Me, 14Me), kladinoze (3"Me, 5"Me) te tiosemikarbazona od kojih su aromatski protoni (17, 18, 20, 21, 25, 26, 27, 28 i 29) te alifatski (22, 23a). Navedene skupine sudjeluju u vezanju na ribosom tj BSA.

Izračunata su pojačanja STD kako bi se potvrdile skupine koje su u bliskom kontaktu s ribosomom, odnosno BSA.

Pojačanja STD izračunata su pomoću formule:

$$I_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0}$$

gdje je I_0 intenzitet signala u referentnom spektru, a I_{SAT} intenzitet signala u zasićenom spektru.⁴

Spektri STD su normalizirani postavljanjem najvećeg signala na 100 %.

Protoni u najbližem kontaktu s receptorom imaju najjača pojačanja STD. U tablici 3 nalaze se izračunate vrijednosti pojačanja STD pri frekvencijama od 10 ppm, 8 ppm i -0,5 ppm nakon dodatka ribosoma. Pojačanja STD za većinu atoma najmanja su pri frekvenciji od 10 ppm, zatim rastu pri frekvenciji od -0,5 ppm te su najveća pri 8 ppm. Vrijednost pojačanja STD nekih metilnih i metilenskih skupina nije bilo moguće točno odrediti jer se signali preklapaju.

Izračunata pojačanja STD najveća su za aromatski prsten tiosemikarbazona te iminski proton kompleksa što ukazuje na to da je tiosemikarbazoni dio u blizini ribosoma. Pri svakoj frekvenciji pojačanje STD od 100 % pripada atomu vodika (27H) aromatskog prstena. Prijenos zasićenja također su opaženi za metilne protone na položajima 3" i 5" u kladinozi.

Tablica 3. Pojaćanja STD za spoj 4"-6 nakon dodatka ribosoma iz *E. coli* pri različitim frekvencijama zasićenja, normalizirano u odnosu na signal najvećeg intenziteta

4"-6 i ribosom	pojaćanja STD		
	<i>on-resonance</i> 10 ppm	<i>on-resonance</i> -0,5 ppm	<i>on-resonance</i> 8 ppm
atom			
14Me	5,4 %	12,2 %	26,6 %
8Me	6,7 %	18,1 %	28,3 %
10Me, 12Me	2,4 %	5,7 %	7,3 %
4Me	4,8 %	12,9 %	30,1 %
2Me	13,0 %	28,3 %	22,1 %
3"Me, 5"Me	6,1 %	17,0 %	7,9 %
5'Me	4,6 %	12,0 %	13,8 %
27	100,0 %	100,0 %	100,0 %
28, 29, 26, 25	48,9 %	60,9 %	49,1 %
18, 20	28,4 %	39,4 %	41,0 %
17, 21	27,6 %	36,4 %	44,4 %
22	31,6 %	40,7 %	49,5 %

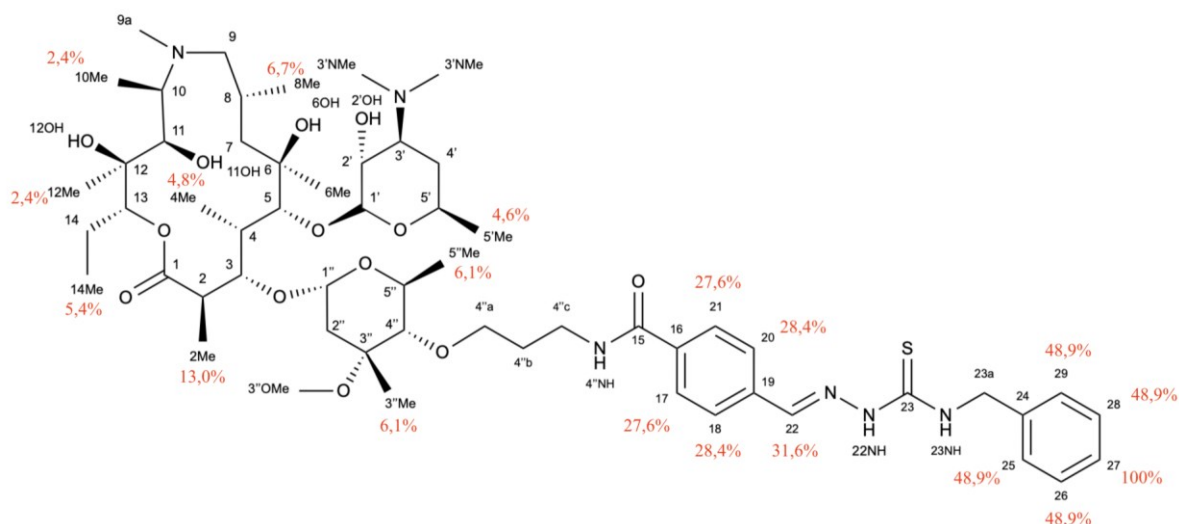
Iako se vezanje 15-eročlanih makrolida na biološke mete malo razlikuje što ovisi o strukturi, tehnika STD je pokazala da su u bliskom kontaktu s ribosomom obično kladinoza, desozamin i metilna skupina 14Me.³ Način vezanja desozamina ne ovisi o veličini aglikona ili njegovoj orijentaciji u odnosu na lumen ribosomskog tunela. Desozamin je usmjeren na ribosomsko P-mjesto i omogućuje malo dulji rast novonastalog peptidnog lanca tijekom translacije. Translacija se zaustavlja nakon stvaranja 4. do 8. peptidne veze. Za razliku od toga kod 16-eročlanih makrolida dolazi do inhibicije translacije pri stvaranju 1. do 2. peptidne veze.

Usporedbom s prijašnjim istraživanjima utvrđeno je da makrozon 4"-6 ima zajedničke epitope vezanja s azitromicinom, a to su skupine 2Me, 14Me i 3"OMe.¹⁰

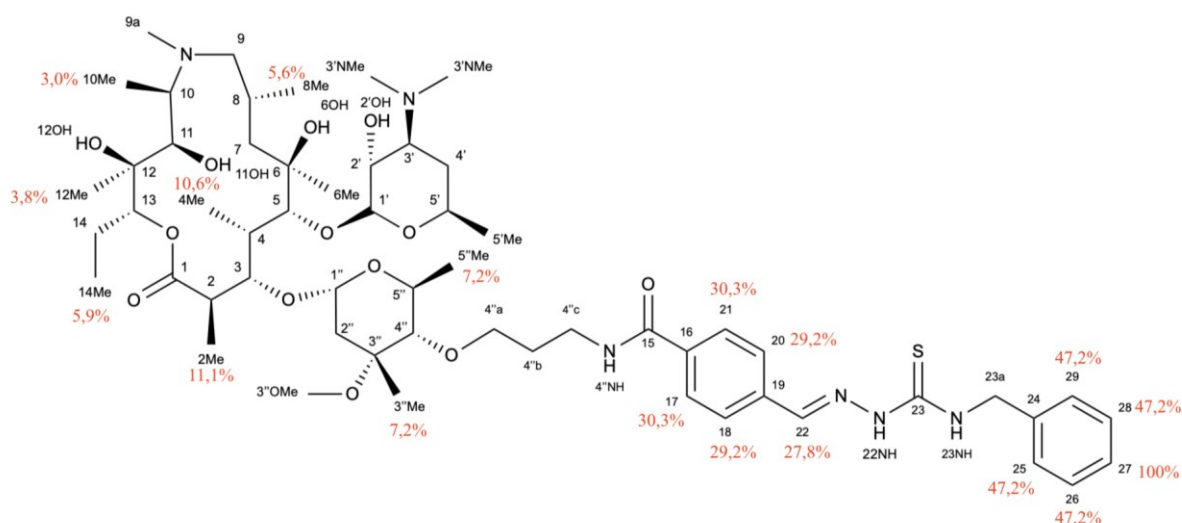
Spektri STD za spoj 4"-6 u interakciji s BSA snimljeni su pri dvije frekvencije, 10 i 0,5 ppm. Vrijednosti pojaćanja su prikazane u tablici 4. Pojaćanja STD pri frekvenciji od 10 ppm snižena su u odnosu na frekvenciju od -0,5 ppm. Najveće pojaćanje pripada također atomu vodika (27H). Veća pojaćanja opažena su za protone aromatskog prstena (25, 26, 28, 29) i iminskog (22) protona što potvrđuje da je tiosemikarbazonski dio vezan na BSA.

Tablica 4. Pojačanja STD za spoj 4"-6 nakon dodatka BSA pri različitim frekvencijama zasićenja, normalizirano u odnosu na signal najvećeg intenziteta

4"-6 i BSA	pojačanja STD	
	on-resonance 10 ppm	on-resonance -0,5 ppm
14Me	5,9 %	16,3 %
8Me	5,6 %	26,3 %
10Me	3,0 %	10,8 %
12Me	3,8 %	14,2 %
4Me	10,6 %	26,0 %
2Me	11,1 %	23,4 %
3"Me, 5"Me	7,2 %	23,8 %
27	100,0 %	100,0 %
25, 26, 28, 29	47,2 %	64,4 %
18, 20	29,2 %	47,2 %
17, 21	30,3 %	47,8 %
22	27,8 %	47,5 %

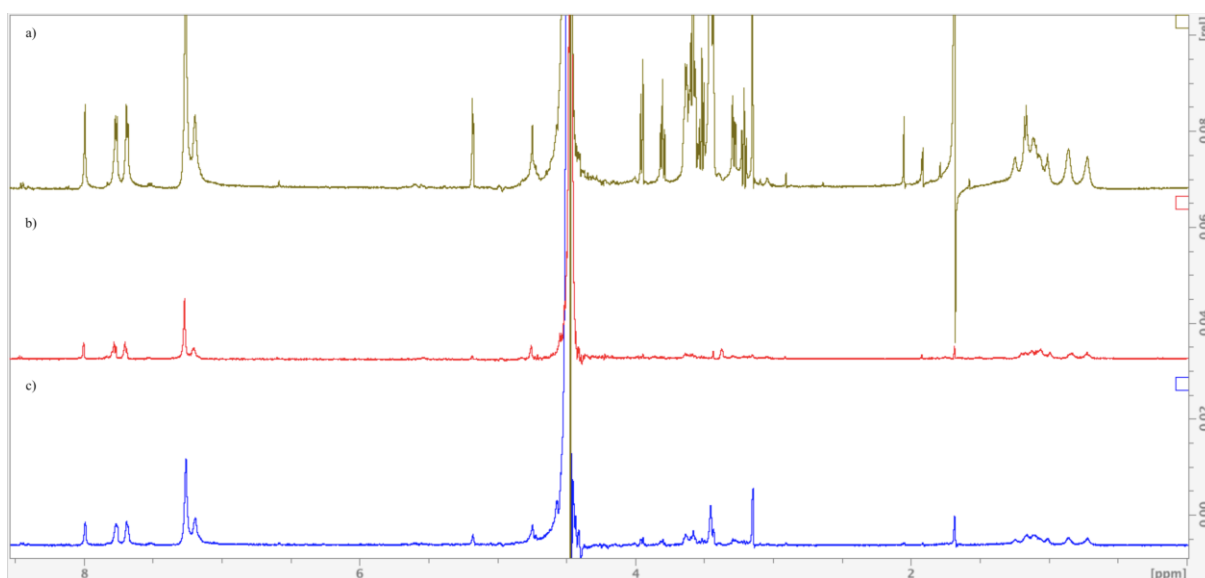


Slika 20. Spoj 4"-6 s prikazanim pojačanjima STD za odgovarajuće atome nakon dodatka ribosoma iz *E. coli*



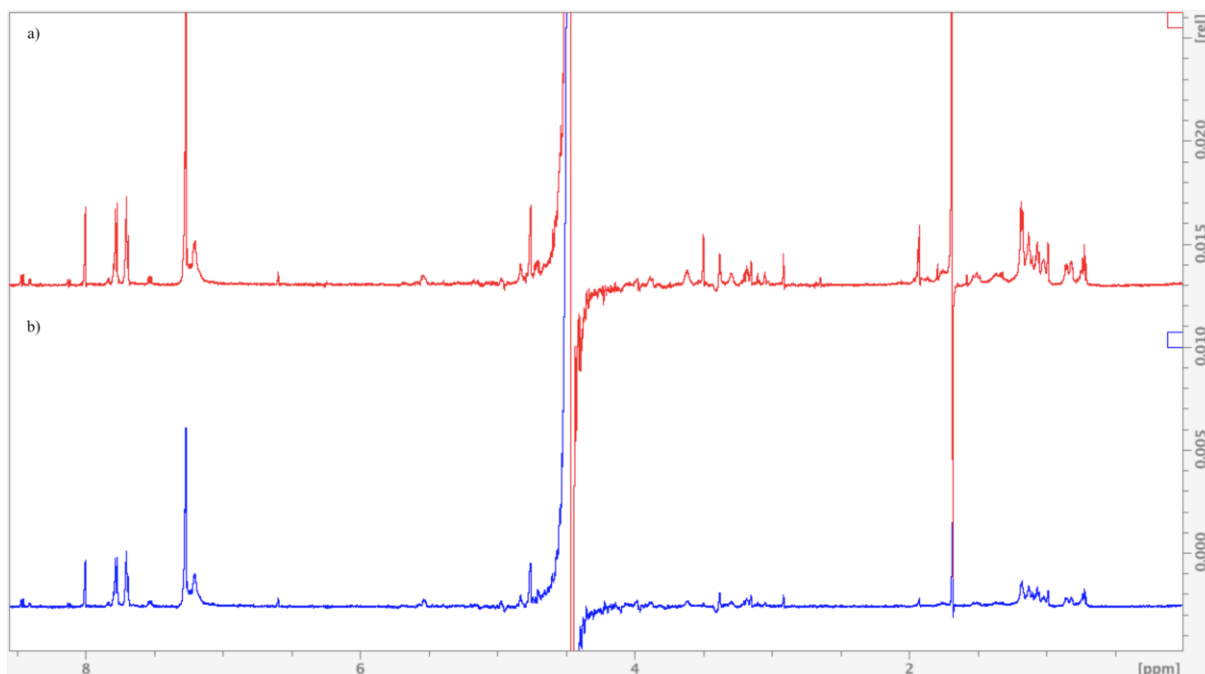
Slika 21. Spoj 4''-6 s prikazanim pojačanjima STD za odgovarajuće atome nakon dodatka BSA

Spektri STD su snimani pri frekvenciji *off-resonance* od 50 ppm. Frekvencija *on-resonance* varirala je između 10 ppm, 8 ppm i -0,5 ppm. Na slici 22 je prikazana usporedba spektara spoja 4''-6 pri različitim frekvencijama nakon dodatka ribosoma. Signali su najintenzivniji pri frekvenciji od -0,5 ppm. Bolji rezultati su dobiveni uz frekvenciju *on-resonance* pri 10 ppm jer je -0,5 ppm preblizu signala metilnih skupina te se direktno pobuđuje jedan dio makrolaktonskog prstena.



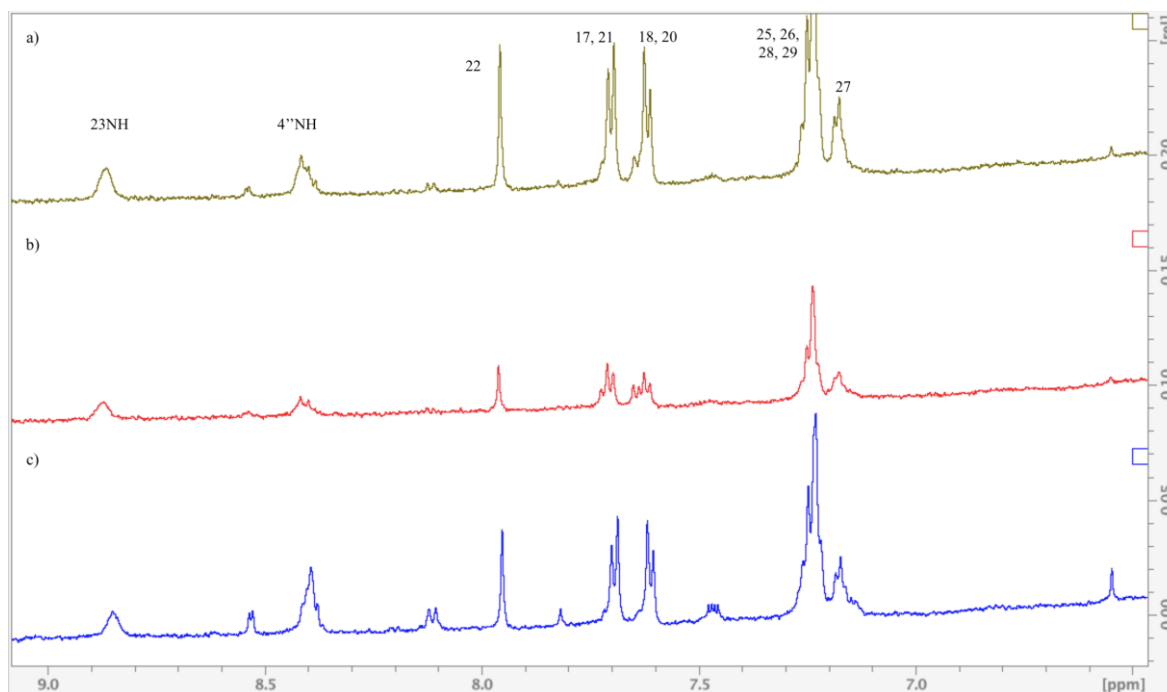
Slika 22. Spektri razlike STD spoja 4''-6 nakon dodatka ribosoma iz *E. coli* pri a) -0,5 ppm, b) 8 ppm i c) 10 ppm

Usporedba spektara STD spoja 4"-6 u interakciji s BSA pri dvije frekvencije *on resonance* od -0,5 ppm i 10 ppm BSA prikazana je na slici 23. Intenzivniji signali dobiveni su pri frekvenciji od -0,5 ppm.



Slika 23. Spektri razlike STD spoja 4"-6 nakon dodatka BSA pri a) -0,5 ppm i b) 10 ppm

U WaterLOGSY tehnici dolazi do prijenosa magnetizacije s vode na biološki receptor te zatim na ligand. Moguće je razlikovati slobodni ligand od liganda koji je vezan. Na slici 24 su prikazani spektri WaterLOGSY spoja 4"-6 nakon dodatka ribosoma iz *E. coli* i BSA. Za razliku od spektra STD, u spektru WaterLOGSY su prisutni signali izmjenjivih protona 4''NH i 23NH. Ako se ligand veže na receptor, signali liganda će biti pozitivni, a ako ne dolazi do vezanja signali će biti negativni.⁶ Signali WaterLOGSY su manje intenzivni kod spoja u vezanom stanju nego kod slobodnog spoja što znači da su manje izloženi vodi, tj. nalaze se dublje u makromolekuli. Spektri WaterLOGSY na slici 24 potvrđuju interakciju tiosemokarbazonskog dijela makrozona s ribosomom i BSA.



Slika 24. Spektri WaterLOGSY tiosemikarbazonih protona pri vremenu miješanja 1,7 s a) spoj 4''-6 prije dodatka ribosoma, b) spoj 4''-6 nakon dodatka ribosoma, c) spoj 4''-6 nakon dodatka BSA

Intenzitet signala WaterLOGSY slobodnog liganda uspoređen je s intenzitetom signala vezanog liganda kako bi se istaknule promjene intenziteta nakon vezanja receptora. Izračunat je intenzitet prije i poslije dodatka receptora pri svakom vremenu miješanja koja su iznosila 0,25 s, 0,75 s i 1,7 s pa su dobiveni faktori WaterLOGSY. Rezultati se nalaze u tablicama 5 i 6.

Faktori WaterLOGSY određeni su prema formuli

$$WLOGSY\ factor = \frac{|(I_{WLOGSY+}) - (I_{WLOGSY-})|}{|(I_{WLOGSY-})|}$$

gdje je $I_{WLOGSY+}$ intenzitet WaterLOGSY nakon dodatka ribosoma/BSA, a $I_{WLOGSY-}$ prije dodatka ribosoma/BSA. Vrijednosti su onda normalizirane prema najvećoj vrijednosti za faktor WaterLOGSY odgovarajućeg proteina postavljenom na 100 %.⁶

Tablica 5. Faktori WaterLOGSY za spoj 4"-6 nakon dodatka ribosoma iz *E. coli* pri različitim vremenima miješanja, normalizirano u odnosu na signal najvećeg intenziteta

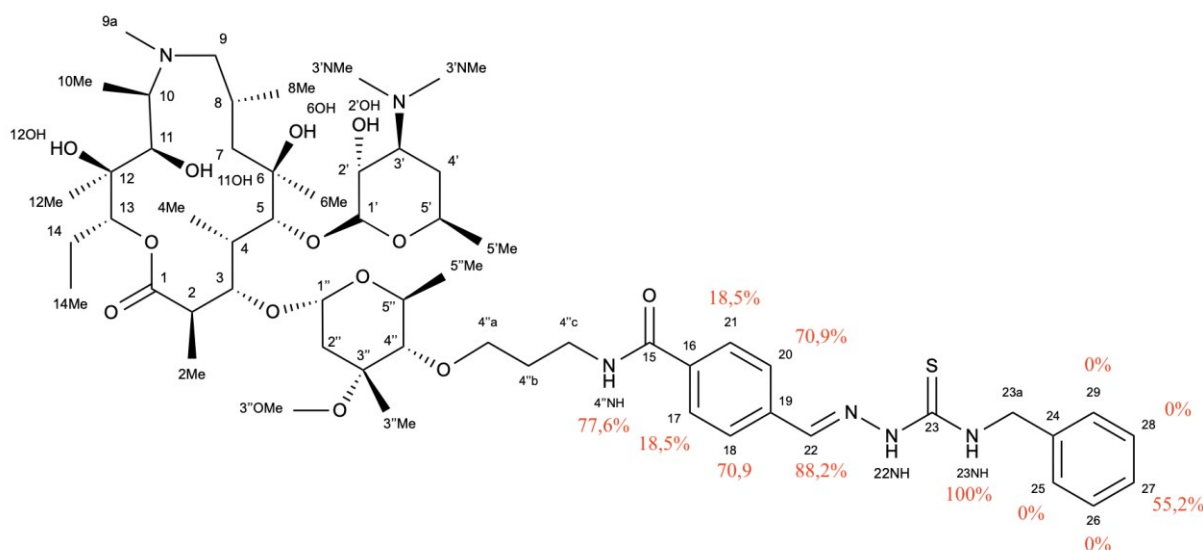
4"-6 i ribosom	faktori WaterLOGSY		
	1,7 s	0,75 s	0,25 s
atom			
27	55,2 %	97,1 %	22,6 %
25, 26, 28, 29	0,0 %	0,0 %	0,0 %
18, 20	70,9 %	25,0 %	48,2 %
17, 21	18,5 %	29,6 %	20,4 %
22	88,2 %	63,0 %	55,6 %
4"NH	77,6 %	85,3 %	100,0 %
23NH	100,0 %	100,0 %	97,6 %

Tablica 6. Faktori WaterLOGSY za spoj 4"-6 nakon dodatka BSA pri različitim vremenima miješanja, normalizirano u odnosu na signal najvećeg intenziteta

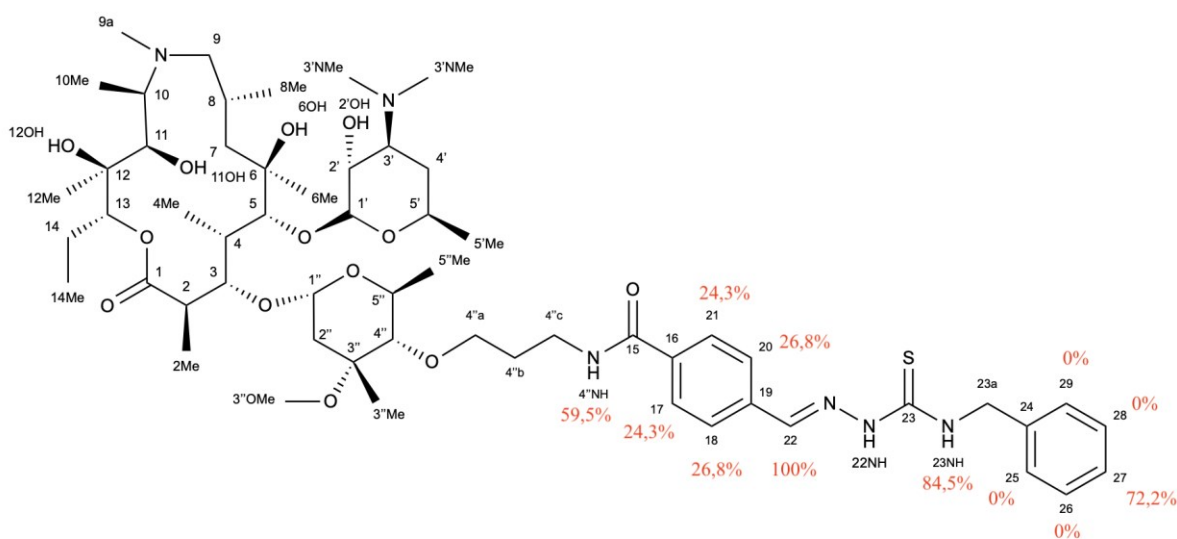
4"-6 i BSA	faktori WaterLOGSY		
	1,7 s	0,75 s	0,25 s
atom			
27	72,2 %	99,6 %	100,0 %
25, 26, 28, 29	0,0 %	15,4 %	11,9 %
18, 20	26,8 %	51,9 %	56,9 %
17, 21	24,3 %	35,6 %	44,8 %
22	100,0 %	17,1 %	20,0 %
4"NH	59,5 %	18,8 %	42,1 %
23NH	84,5 %	100,0 %	65,4 %

Faktori WaterLOGSY određeni su samo za aromatski dio spoja. Nije bilo moguće odrediti faktore WaterLOGSY za metilne skupine azitromicinskog djela spoja zbog preklapanja signala. Najslabiji faktor WaterLOGSY odgovara protonu koji je najviše okružen vodom. Ova tehnika služi za potvrdu vezanja dobivenih iz spektra STD, a može dati i podatke o tome koliko je ligand uronjen u receptor.

Najslabiji faktor WaterLOGSY pripada protonima benzena u položajima 25, 26, 28 i 29 u interakciji s BSA i s ribosomom. Najveći prijenos magnetizacije primaju izmjenjivi protoni 23NH, 4''NH te protoni u položajima 22 i 27.

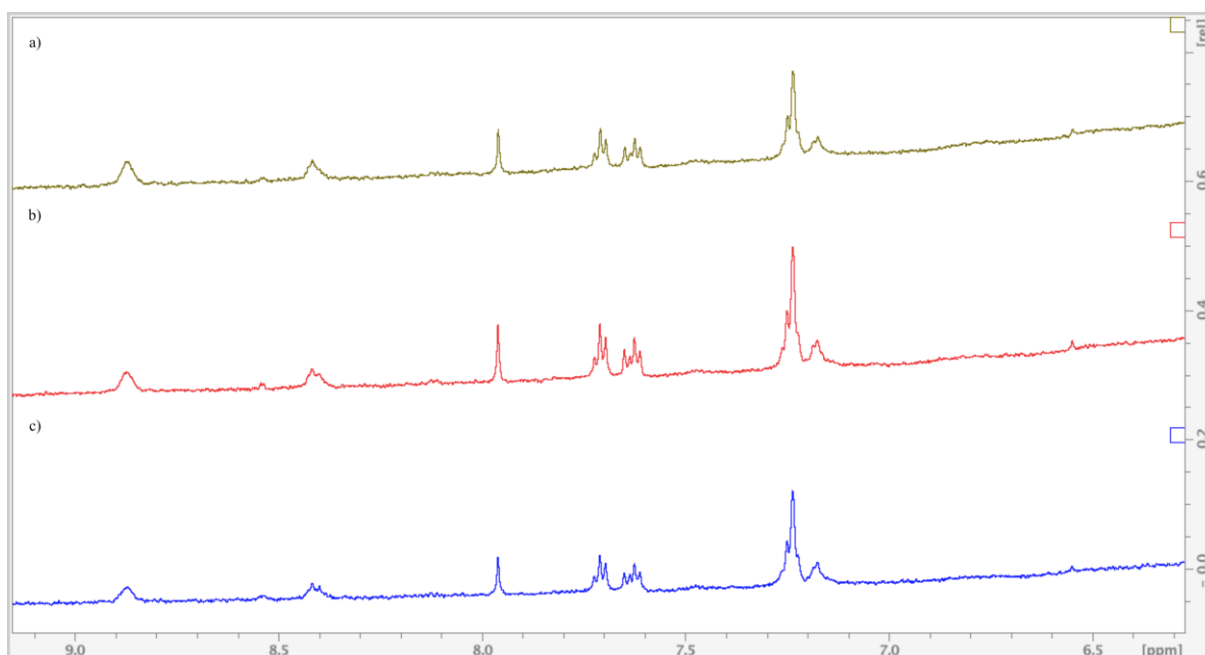


Slika 25. Spoj 4''-6 s prikazanim faktorima WaterLOGSY za odgovarajuće atome nakon dodatka ribosoma iz *E. coli*, vrijeme miješanja 1,7 s

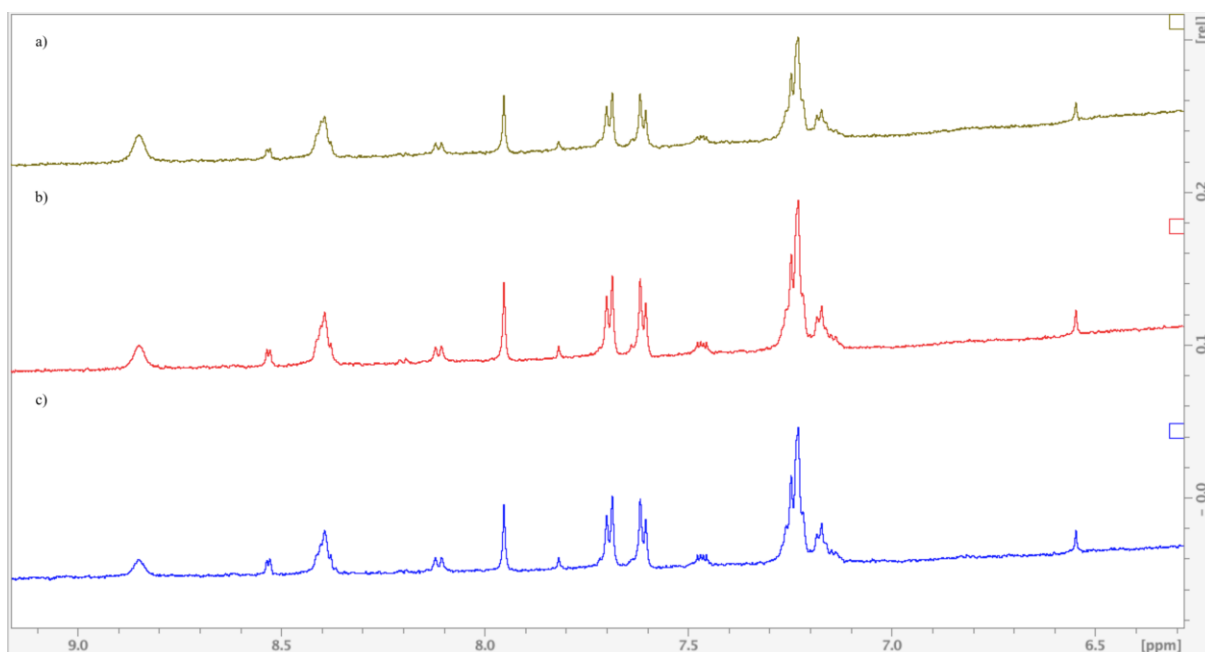


Slika 26. Spoj 4''-6 s prikazanim faktorima WaterLOGSY za odgovarajuće atome nakon dodatka BSA, vrijeme miješanja 1,7 s

Spektri s vremenima miješanja od 0,25 s, 0,75 s i 1,7 s su slični. Pri 9 ppm nalaze se izmjenjivi protoni 2³NH i 4^{''}NH čiji se intenziteti razlikuju pri različitim vremenima miješanja.



Slika 27. Aromatski dio spektara WaterLOGSY spoja 4^{''}-6 nakon dodatka ribosoma iz *E. coli*, pri različitim vremenima miješanja: a) 0,25 s, b) 0,75 s i c) 1,7 s

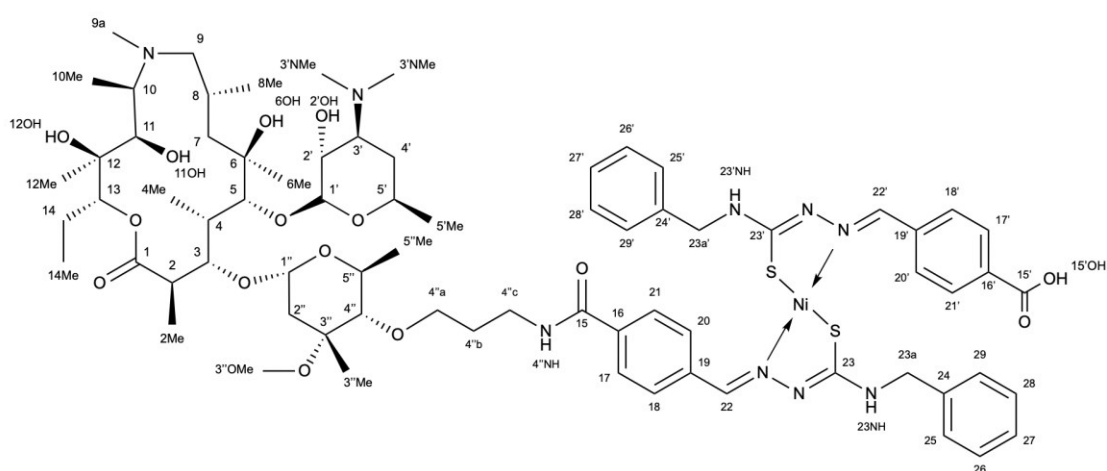


Slika 28. Aromatski dio spektara WaterLOGSY spoja 4^{''}-6 nakon dodatka BSA, pri različitim vremenima miješanja: a) 0,25 s, b) 0,75 s i c) 1,7 s

4.2. Karakterizacija kompleksa makrozona s niklom, M4''-NiP6

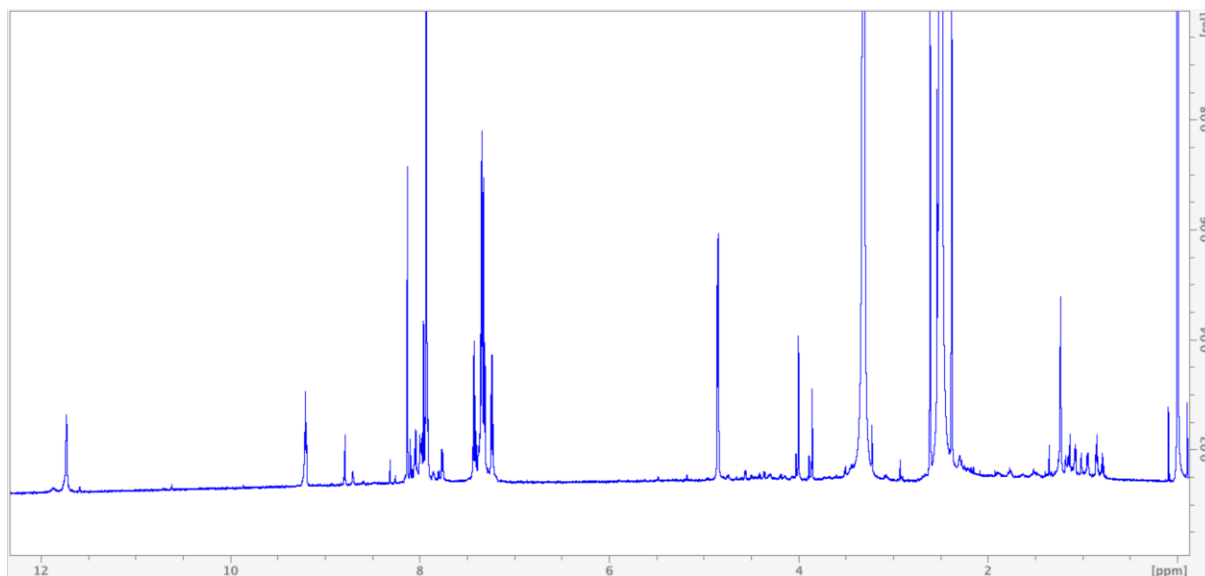
Kompleks makrozona s niklom(II) nastaje povezivanjem spoja 4''-6 s još jednim tiosemikarbazonom. Dolazi do nukleofilnog napada amino skupine na karboksilnu skupinu.

U strukturi tiosemikarbazona nalazi se dušik i sumpor koji predstavljaju dobre donorske atome za stvaranje koordinacijske veze s metalnim kationima. Kompleksiranjem tiosemikarbazona s niklom(II) dolazi do procesa tautomerizacije, tj. promjene jednostruke C-N veze u dvostruku, a dvostruka veza C=S prelazi u jednostruku te dolazi do prijelaza iz tionskog u tiolni oblik.



Slika 29. Struktura 4''-benzil-makrozona u kompleksu s niklom s označenim atomima

Na slici 30 prikazan je spektar ^1H NMR 4''-benzil-makrozona u kompleksu s niklom. U području od 6,5 do 8,5 ppm nalaze se signali koji odgovaraju aromatskom protonima tiosemikarbazona. Nije bilo moguće asignirati sve atome vodika jer se neki signali preklapaju. U tablici 7 se nalaze kemijski pomaci u spektru ^1H NMR. Za razliku od spektra ^1H NMR spoja 4''-6, ovdje je prisutan intenzivan signal pri 11,7 ppm koji odgovara protonu OH u karboksilnoj skupini.



Slika 30. Spektar ^1H NMR spoja $\text{M4}''\text{-NiP6}$ prije dodatka ribosoma iz *E. coli* u fosfatnom puferu i DMSO-d_6 pri 298 K

Tablica 7. Asignacija kemijskih pomaka ^1H spoja $\text{M4}''\text{-NiP6}$ u fosfatnom puferu

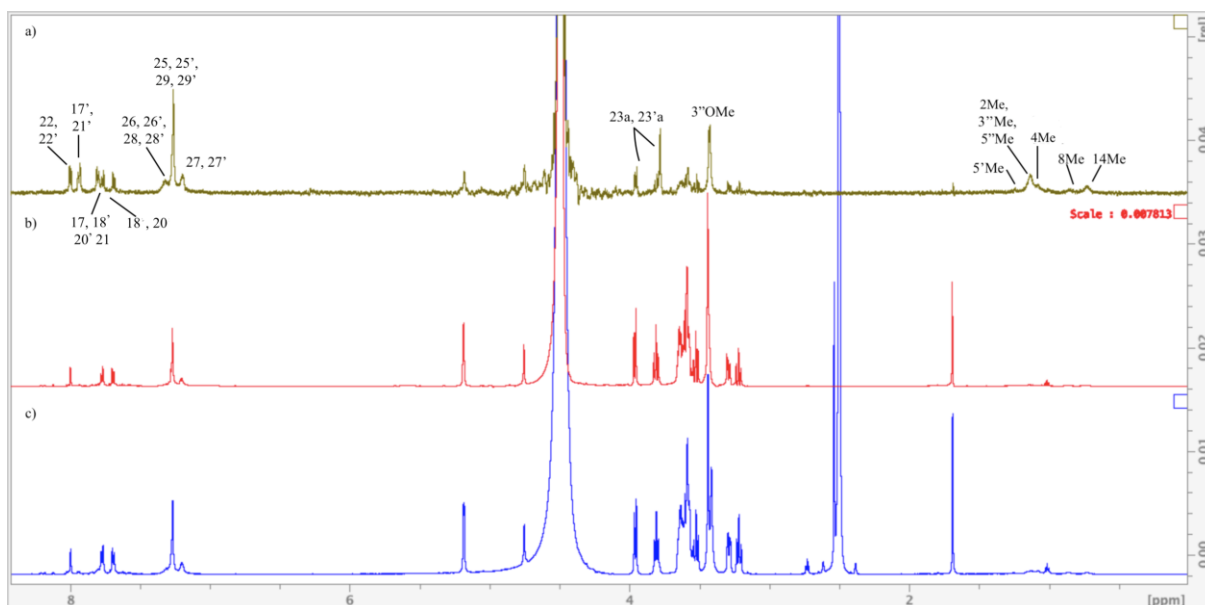
atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$
2	-	22, 22'	8,13
2Me	-	23a, 23a'	4,86
3	4,50	23NH, 23'NH	9,21
4	2,28	25, 25', 29, 29'	7,34
4Me	1,08	26, 26', 28, 28'	7,43
5	4,36	27, 27'	7,24
6Me	1,24	1'	-
6OH	-	2'	4,00
7	-	2'OH	-
8	2,30	3'	2,61
8Me	0,95	3'NMe	2,50
9	2,38	4'	-
9a	2,50	5'	-
10	2,93	5'Me	-

10Me	1,15	15'OH	11,74
11	-	1"	-
11OH	-	2"	1,90
12Me	1,14	3"Me	1,24
12OH	4,03	3"OMe	3,32
13	4,56	4"	3,89
14	1,51	4"a	4,19
14Me	0,79	4"b	2,18
18, 20	7,76	4"c	3,86
17, 21	7,93	4"NH	8,79
17', 21'	7,99	5"	4,41
18', 20'	7,80	5"Me	1,77

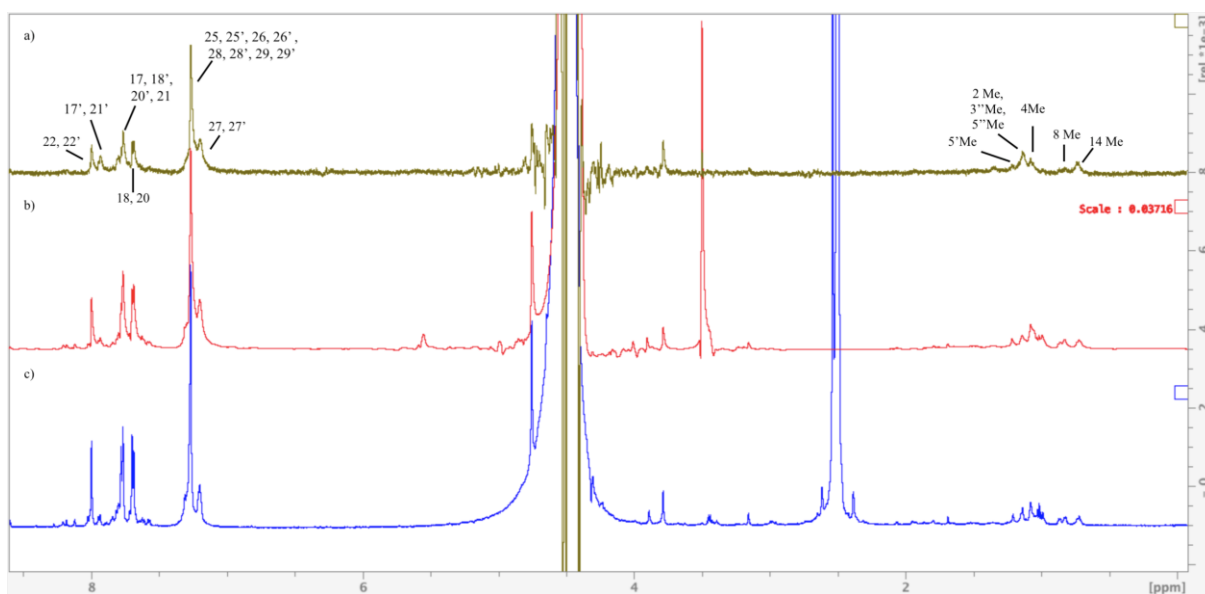
-signal nije detektiran

U spektrima razlike STD na slikama 31 i 32 prikazani su atomi vodika makrozona M4"-NiP6 koji se prostorno nalaze najbliže ribosomu/BSA i oni su najvećeg intenziteta. Spektri razlike STD nakon dodataka ribosoma i BSA su slični u području 1.5-0.5 ppm za atome vodika kladinoze, desozamina i aglikonskog prstena. Spektri se razlikuju u području od 8 do 7 ppm gdje se nalaze aromatski protoni u dvjema tiosemikarbazonskim jedinicama. Malo bolje razlučivanje spektara razlike STD je postignuto nakon dodatka ribosoma u usporedbi sa spektrima kompleksa s BSA.

Epitopi vezanja za makrozon M4"-NiP6 su slični kao i za spoj 4"-6, osim što ovdje u vezanju sudjeluju i atomi vodika drugog tiosemikarbazonskog prstena (17', 18', 20', 21', 22', 25', 26', 27', 28', 29').



Slika 31. a) Spektar razlike STD spoja M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma pri 10 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka ribosoma i c) spektar ^1H NMR prije dodatka ribosoma



Slika 32. a) Spektar razlike STD spoja M4''-NiP6 nakon dodatka BSA pri 10 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka BSA i c) spektar ^1H NMR prije dodatka BSA

Prijenosi zasićenja nakon dodatka ribosoma i kod makrozona M4''-NiP6 veći su za aromatski tiosemikarbazon i iminski proton nego za ostatak molekule. Pri frekvenciji *on-resonance* od 50 ppm najveće pojačanje STD odgovara protonima tiosemikarbazona 25, 25', 29, 29', dok pri frekvenciji -0,5 ppm i 8 ppm pojačanje od 100 % odgovara protonima 26, 26', 28, 28'.

Za razliku od pojačanja STD u kompleksu makrozon-ribosom, prijenosi zasićenja nakon dodatka BSA najveća su za atome tiosemikarbazona 27 i 27'.

Tablica 8. Pojačanja STD za spoj M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma iz *E. coli* pri različitim frekvencijama zasićenja, normalizirano u odnosu na signal najvećeg intenziteta

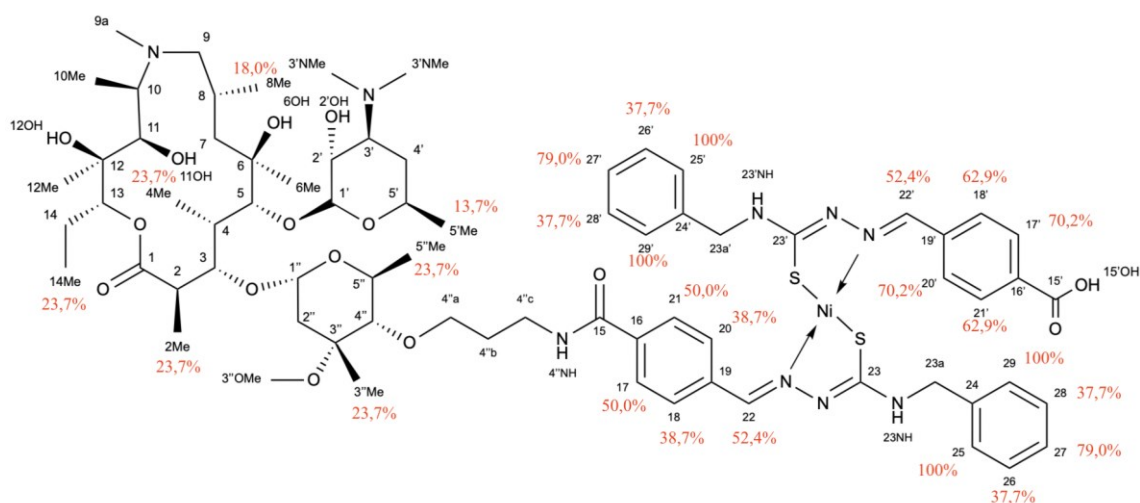
M4''-NiP6 i ribosom	pojačanja STD		
	<i>on-resonance</i> 10 ppm	<i>on-resonance</i> -0,5 ppm	<i>on-resonance</i> 8 ppm
atom			
14Me	23,7 %	22,2 %	31,2 %
8Me	18,0 %	18,3 %	15,2 %
4Me	23,7 %	39,7 %	29,8 %
2Me, 3''Me, 5''Me	23,7 %	18,7 %	27,6 %
5'Me	13,7 %	17,1 %	16,5 %
27, 27'	79,0 %	26,6 %	58,7 %
25, 25', 29, 29'	100,0 %	33,3 %	82,5 %
26, 26', 28, 28'	37,7 %	100,0 %	100,0 %
18, 20	38,7 %	20,7 %	49,7 %
17, 21	50,0 %	23,7 %	63,6 %
18', 20'	62,9 %	18,3 %	47,7 %
17', 21'	70,2 %	18,0 %	43,2 %
22, 22'	52,4 %	17,7 %	48,8 %

Tablica 9. Pojačanja STD za spoj M4''-NiP6 nakon dodatka BSA pri različitim frekvencijama zasićenja, normalizirano u odnosu na signal najvećeg intenziteta

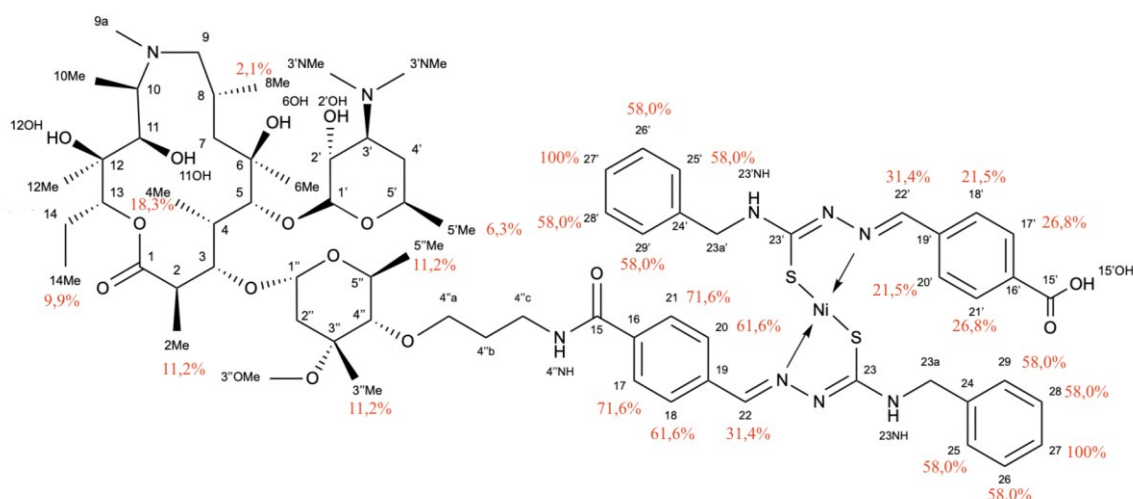
M4''-NiP6 i BSA	pojačanja STD	
	<i>on-resonance</i> 10 ppm	<i>on-resonance</i> -0,5 ppm
atom		
14Me	9,9 %	23,0 %

8Me	2,1 %	18,1 %
4Me	18,3 %	14,2 %
2Me	11,2 %	59,2 %
3"Me, 5"Me	11,2 %	25,6 %
5'Me	6,3 %	22,1 %
27, 27'	100,0 %	100,0 %
25, 25', 26, 26', 28, 28', 29, 29'	58,0 %	41,2 %
18, 20	61,6 %	46,4 %
17, 21	71,6 %	50,5 %
18', 20'	21,5 %	11,2 %
17', 21'	26,8 %	14,4 %
22, 22'	31,4 %	17,3 %

Kao i za spoj 4"-6, izračunata pojačanja STD najveća su za aromatski dio te iminski proton kompleksa što ukazuje na to da su dva tiosemikarbazonaska dijela u kontaktu s ribosomom, odnosno BSA.

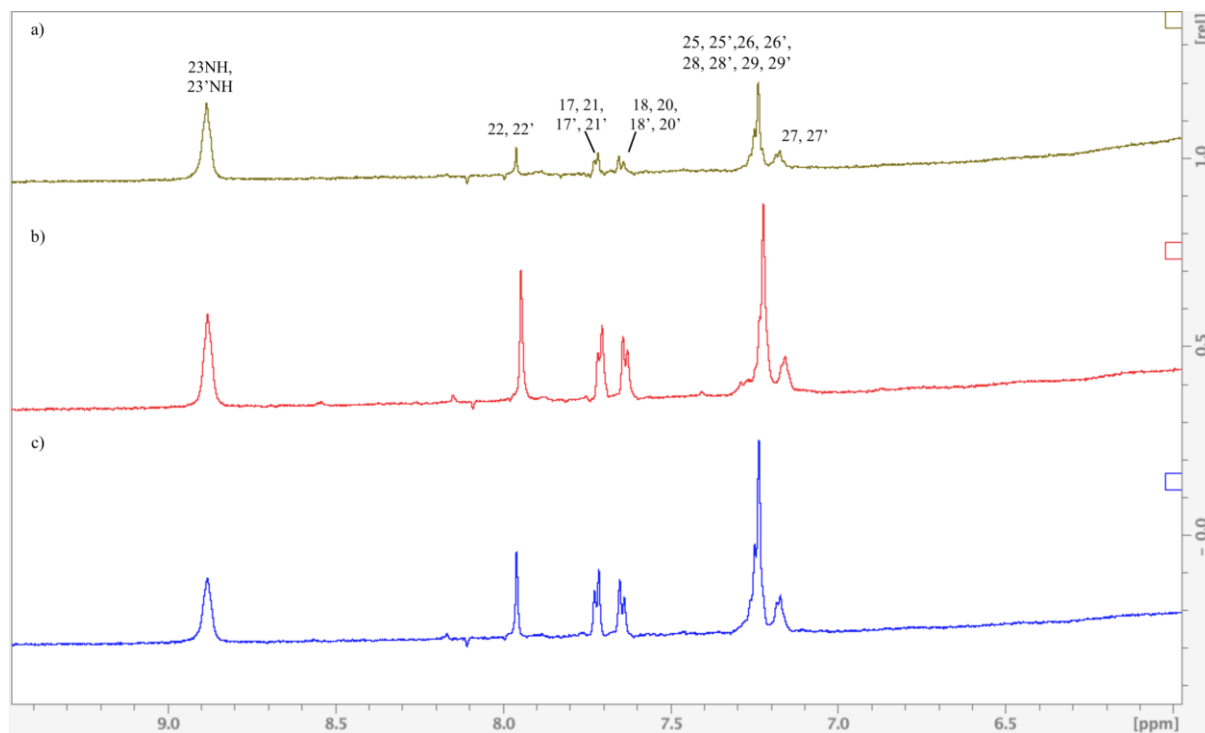


Slika 33. Spoj M4"-NiP6 s prikazanim pojačanjima STD za odgovarajuće atome nakon dodatka ribosoma iz *E. coli*



Slika 34. Spoj M4''-NiP6 s prikazanim pojačanjima STD za odgovarajuće atome nakon dodatka BSA

Na slici 35 nalaze se asignirani signali atoma koji su u bliskom kontaktu s BSA. Spektar WaterLOGSY makrozona M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma sličan je onome nakon dodatka BSA. Aromatski dio spektra WaterLOGSY potvrđuje rezultate dobivene iz spektra STD, koji pokazuje da dvije tiosemokarbazonske jedinice interagiraju s ribosomom i BSA.



Slika 35. Spektri WaterLOGSY tiosemikarbazonских protona pri vremenu mješanja 1,7 s: a) spoj M4''-NiP6 prije dodatka BSA, b) spoj M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma, c) spoj M4''-NiP6 nakon dodatka BSA

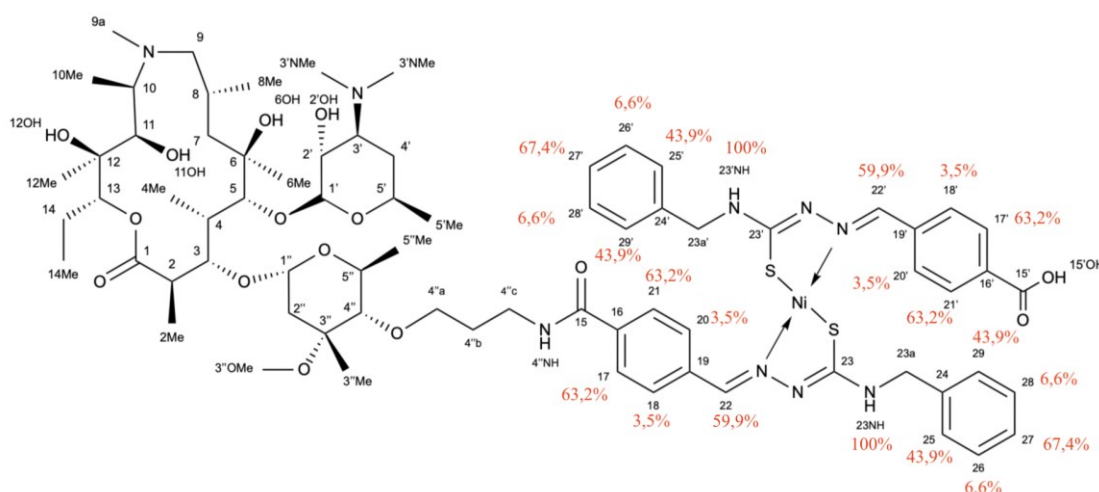
Faktori WaterLOGSY razlikuju se ovisno o trima vremenima miješanja pri kojima je proveden eksperiment. Pri vremenu miješanja od 1,7 s atomi vodika amino skupina (23NH i 23'NH) primaju najveću magnetizaciju, dok pri vremenu miješanja od 0,75 s i 0,25 s to primaju iminski protoni (22 i 22') što je prikazano u tablici 10.

Tablica 10. Faktori WaterLOGSY za spoj M4''-NiP6 nakon dodatka BSA pri različitim vremenima miješanja, normalizirano u odnosu na signal najvećeg intenziteta

M4''-NiP6 i BSA atom	faktori WaterLOGSY		
	1,7 s	0,75 s	0,25 s
27, 27'	67,4 %	7,1 %	27,7 %
25, 25', 29, 29'	43,9 %	41,6 %	48,7 %
26, 26', 28, 28'	6,6 %	41,6 %	48,7 %
18, 18', 20, 20'	3,5 %	56,4 %	22,4 %
17, 17', 21, 21'	63,2 %	51,4 %	14,4 %
22, 22'	59,9 %	100,0 %	100,0 %
23NH, 23'NH	100,0 %	3,3 %	0,0 %

Tablica 11. Faktori WaterLOGSY za spoj M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma pri različitim vremenima miješanja, normalizirano u odnosu na signal najvećeg intenziteta

M4''-NiP6 i ribosom	faktori WaterLOGSY	
	0,75 s	0,25 s
atom		
27, 27'	13,0 %	19,7 %
25, 25', 29, 29'	88,2 %	20,0 %
26, 26', 28, 28'	4,6 %	2,2 %
18, 18', 20, 20'	7,6 %	15,2 %
17, 17', 21, 21'	3,7 %	16,6 %
22, 22'	100,0 %	100,0 %

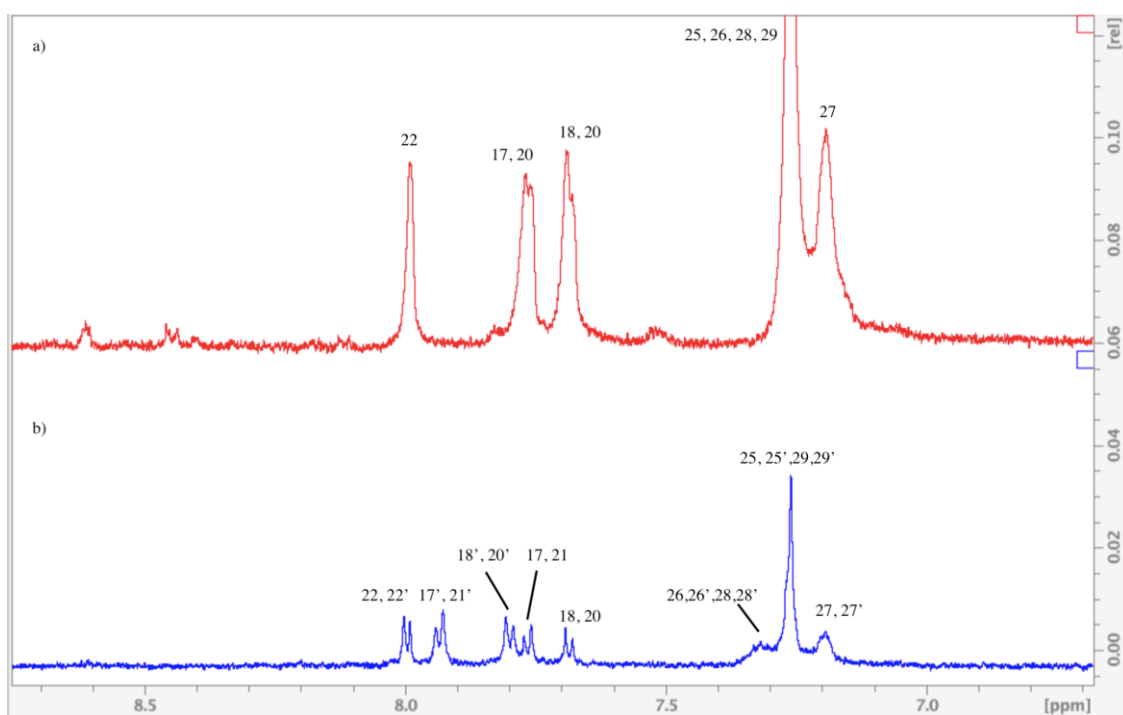


Slika 36. Spoj M4''-NiP6 s prikazanim faktorima WaterLOGSY za odgovarajuće atome nakon dodatka BSA, vrijeme miješanja 1,7 s

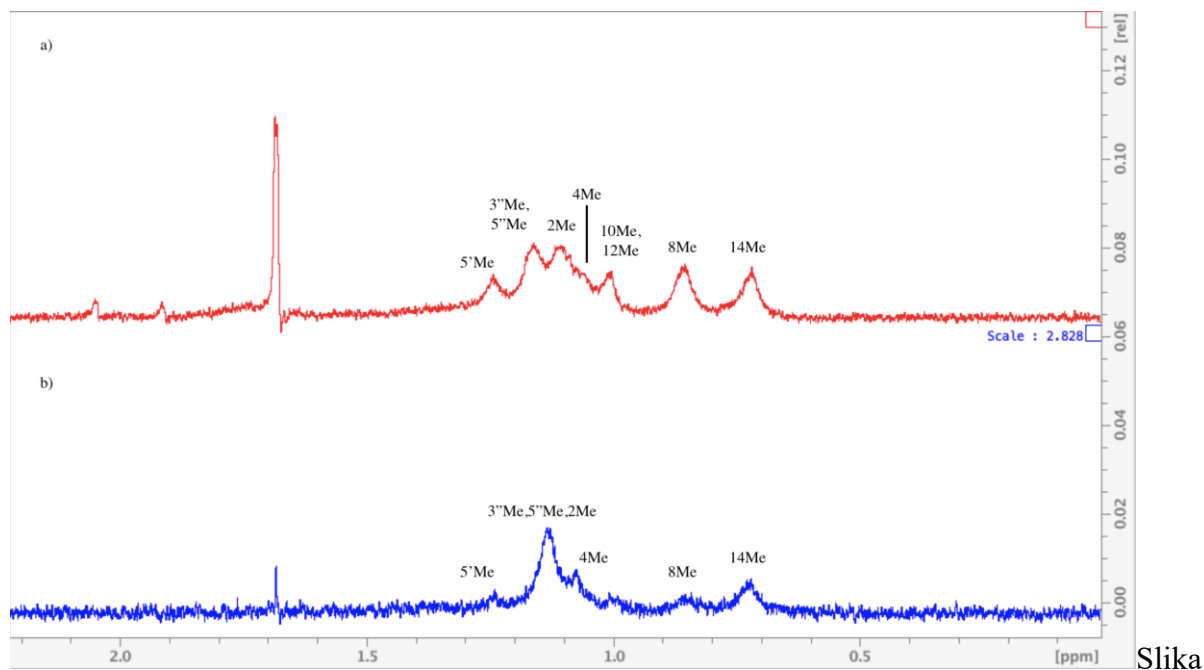
4.3. Usporedba makrozona 4''-6 i M4''-NiP6

Na slikama 37-40 prikazani su spektri STD spoja 4''-6 te spoja u kompleksu s niklom M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma ili BSA. Prikazane su skupine koje pokazuju jake signale

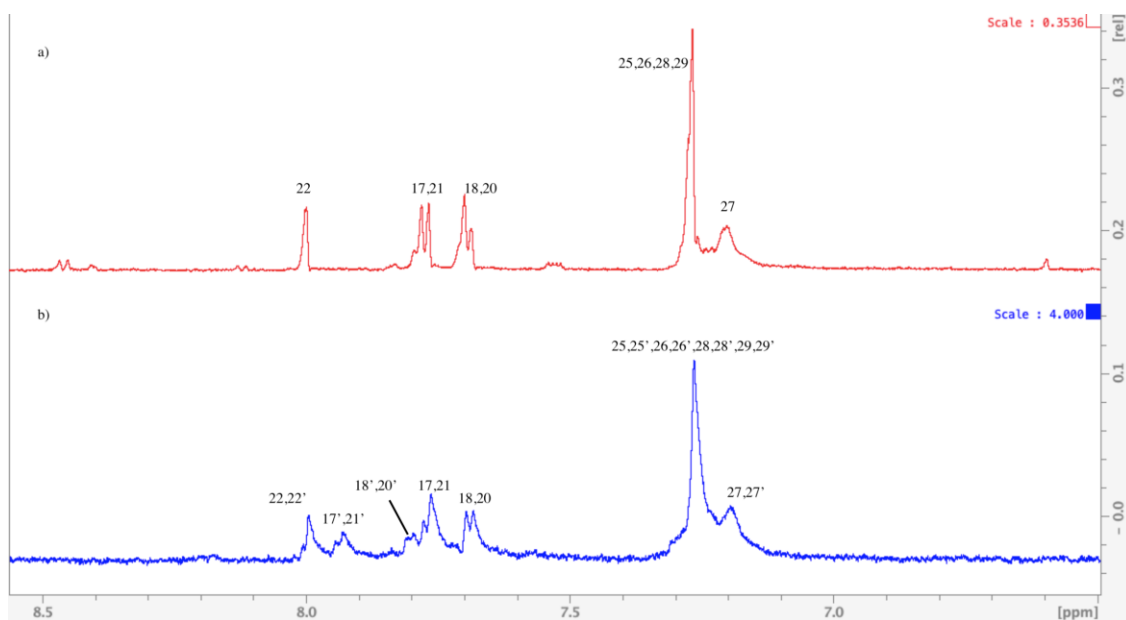
STD. Usporedbom spektara STD vidljivo je da se derivat azitromicina 4"-6 i njegov kompleks s niklom slično vežu za ribosom tj. BSA.



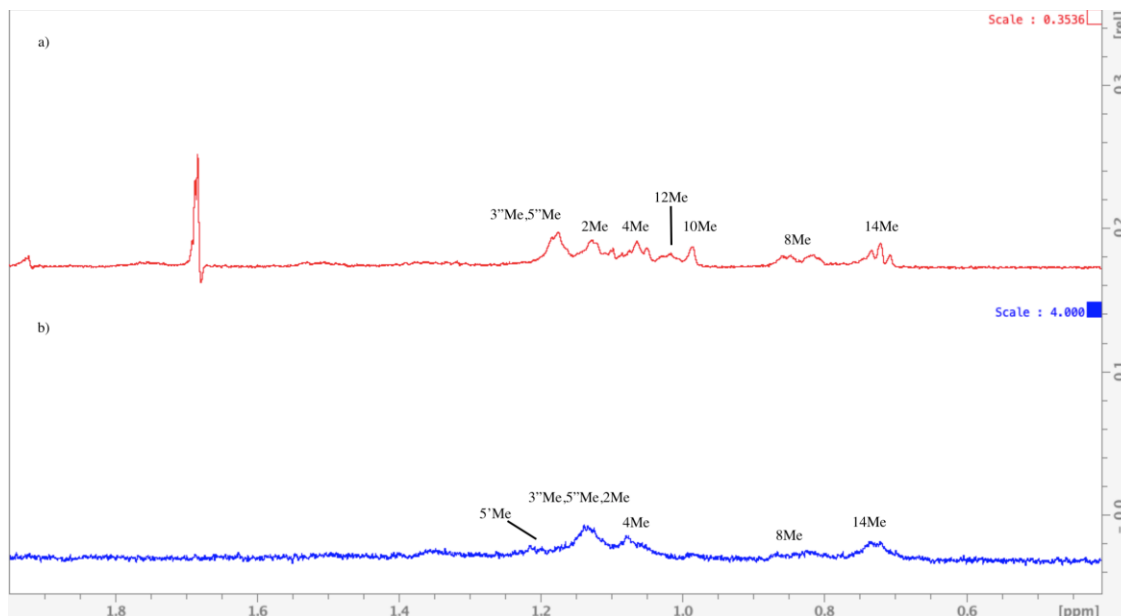
Slika 37. Aromatski dio spektara razlike STD nakon dodatka ribosoma iz *E. coli.*: a) spoj 4-6", b) M4"-NiP6;



Slika 38. Alifatski dio spektara razlike STD nakon dodatka ribosoma iz *E. Coli.*: a) spoj 4-6", b) M4"-NiP6;



Slika 39. Aromatski dio spektara razlike STD nakon dodatka BSA: a) spoj 4-6", b) M4"-NiP6;



Slika 40. Alifatski dio spektra razlike STD nakon dodatka BSA: a) spoj 4-6'', b) M4''-NiP6;

Najjače signale u spektru STD imaju aromatski i iminski protoni što ukazuje na to da je tiosemikarbazoni dio molekule najbliže ribosomu, odnosno BSA. Signali STD alifatskog djela molekule su vrlo slabi. U strukturi kompleksa s niklom prisutna je još jedna tiosemikarbazona podjedinica što omogućava dodatnu interakciju s ribosomom, te vjerojatno zbog toga pokazuje bolju aktivnost na rezistentne bakterije. Vrlo je zanimljiva i činjenica da spoj M4''-NiP6 pokazuje aktivnost na Gram negativnu bakteriju *E. Coli* dok početni makrozon 4-6'' i azitromicin nisu aktivni na taj soj. Jedan od razloga tomu jest činjenica da je M4''-NiP6 polarniji od drugih zbog postojanja slobodne karboksilne skupine pa lakše prolazi kroz polarnu vanjsku bakterijsku membranu što omogućuje bolje vezanje na ribosom. Nadalje, obje tiosemikarbazonke doprinose ukupnoj energiji vezanja.

Rezultati dobiveni spektroskopijom NMR potvrđeni su molekulskim modeliranjem i fluorometrijom.³² Molekulskim modeliranjem dokazano je da se makrolidni dio makrozona veže na isto mjesto kao i azitromicin, dok tiosemikarbazoni dio može imati više načina vezanja. Uočeno je nekoliko jakih $\pi - \pi$ interakcija i vodikovih veza što ukazuje na specifično vezanje dvije tiosemikarbazonke jedinice. Između spoja 4''-6 i džepa za vezanje makrolida dolazi do stvaranja vodikovih veza s nukleotidom U2585 i interakcija $\pi - \pi$ s nukleotidom

G2061. Kod makrozona M4"-NiP6 dva tiosemikarbazonska dijela su u bliskom kontaktu s različitim nukleotidima ribosoma između kojih se uspostavljaju vodikove veze i π - π interakcije.

Za određivanje konstante vezanja korištena je fluorimetrija koja također može dati podatke o interakcijama makrolida. Fluorimetrijska spektroskopija se može primijeniti na spojeve koji sadrže aromatske sustave jer oni fluoresciraju. Titracijom 4"-6 s BSA došlo je do snažnog gašenja fluorescencije. Fluorimetrijskom titracijom pokazano je da se makrozon 4"-6 umjereno veže za BSA.³²

§ 5. ZAKLJUČAK

4"-benzil makrozon i njegov kompleks s niklom pokazali su antimikrobno djelovanje na razne Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Aktivni su i na neke rezistentne sojeve kao što su *S. aureus* i *S. pneumoniae* na koje azitromicin nije aktivan. Kompleks makrozona s niklom pokazao je osam puta bolju aktivnost prema ribosomu iz *E. coli* za razliku od slobodnog makrozona 4"-6 i azitromicina. To se pripisuje prisutnosti slobodne karboksilne skupine koja povećava polarnost i omogućuje bolje vezanje za membranu Gram-negativnih bakterija. Isto tako sadrži dvije tiosemikarbazonske jedinice što povećava afinitet za vezanje za bakterijski ribosom.

U ovome radu pokazano je da je spektroskopija NMR učinkovita metoda za proučavanje interakcija između makrozona i bioloških meta kao što su ribosom iz *E. coli* i albumina iz goveđeg seruma. Pokazano je da se proučavani makrolidi vežu na obje makromolekule. Pomoću tehnika STD i WaterLOGSY NMR potvrđeno je vezanje makrozona na makromolekule te su određeni epitopi vezanja, odnosno dijelovi makrozona u neposrednom kontaktu sa receptorima.

Istraživanje je pokazalo da prilikom vezanja za biološke mete makrolidni dio molekule zauzima uobičajeno mjesto za vezanje makrolida, dok se tiosemikarbazonski dio proteže dalje niz izlazni tunel ribosoma. Ove dodatne interakcije vezanja najvjerojatnije su odgovorne za aktivnost makrozona na rezistentnih bakterijskih sojeva.

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

BSA – goveđi serumski albumin

DMSO – dimetil-sulfoksid

MeOH – metanol

MLS_B –tip rezistencije na makrolide, linkozamide, streptogramine B

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

NOE – nuklearni Overhauserov efekt

RNA – ribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

STD – engl. *saturation transfer difference*

tRNA – transportna ribonukleinska kiselina

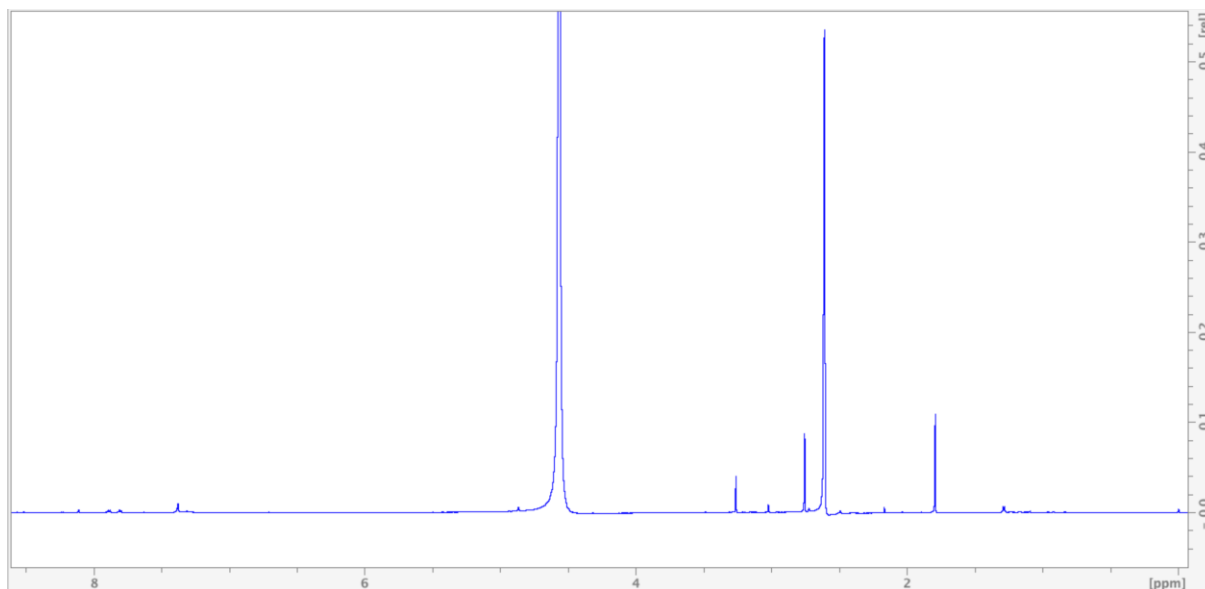
WaterLOGSY- engl. *Ligand Observed via Gradient Spectroscopy*

§ 7. LITERATURNI IZVORI

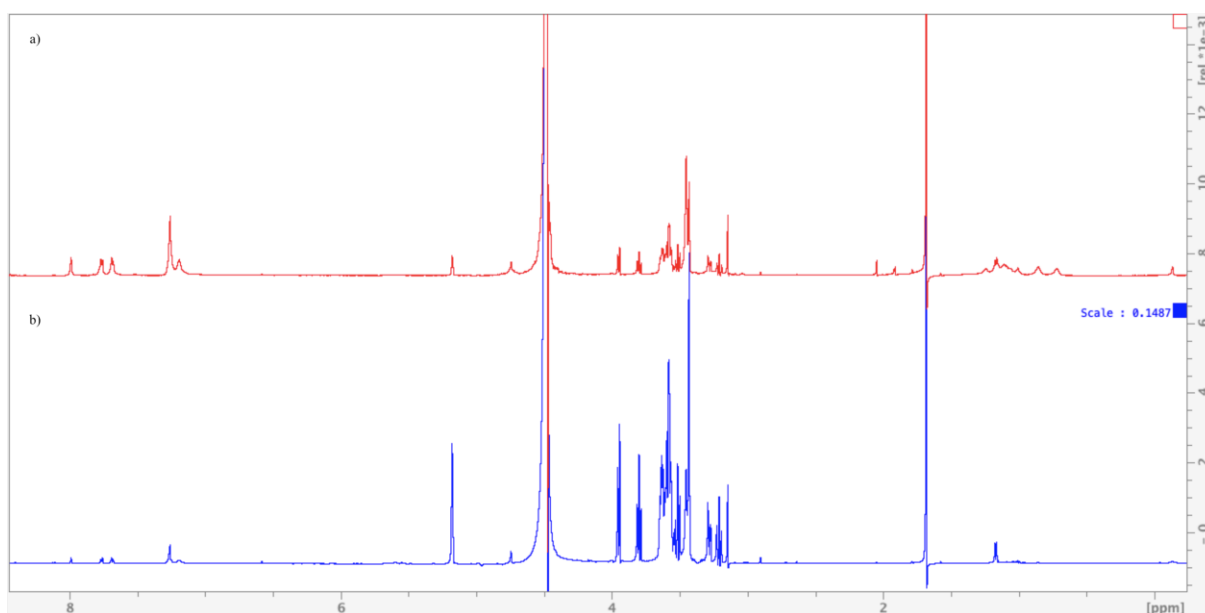
1. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* **56** (2020) 106147.
2. I. Mikulandra, T. Jednačak, B. Bertoša, J. Parlov Vuković, I. Kušec, P. Novak, *Materials* **2021**, *14*, 5561.
3. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 77–99.
4. A. Walpole, S. Monaco, R. Nepravishta, J. Angulo, *Methods Enzymol.* **615** (2019) 423–451.
5. P. Novak, T. Jednačak, Z. Mandić (ur.) IAPC Publishing, Zagreb, 2012, pp. 189–231.
6. C. Raingeval, O. Cala, B. Brion, M. Le Borgne, R. E. Hubbard, I. Krimm, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **34** (2019) 1218–1225.
7. L. Katz, A.S. Mankin T. Schmidt (ur.), *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, Massachusetts, (2009) 529–558.
8. M. Miklasińska-Majdanik, *Antibiotics*, Basel (2021) 1–23.
9. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* **63** (2020) 6462–6473.
10. B. Arsić, P. Novak, M. G. Rimoli, J. Barber, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and applications*, De Gruyter, Berlin, 2019
11. Z. Banić Tomišić, *Kem. Ind.* **60** (2011) 603–617.
12. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics* **5** (2016) 1–13.
13. C. Fyfe, T. H. Grossman, K. Kerstein, J. Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **10** (2016).
14. J. C. Pechere, *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18** (2001) 25–28.
15. R. Leclercq, *Clinical Infectious Diseases* **34** (2002) 482–492.
16. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 1–73.
17. M. J. M. Campbell, *Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazones*, Coordination Chemistry Reviews, London, 1975.
18. M. Islam, A. Khan, M. T. Shehzad, A. Hameed, N. Ahmed, S. A. Halim, M. Khat, M. U. Anwar, J. Hussain, R. Csuk, Z. Shafiq, A. Al-Harrasi, *Bioorg. Chem.* **87** (2019) 155–162.
19. S. Eglence-Bakir, *Turk. J. Chem.* **45** (2021) 835–844.
20. N. P. Prajapati, H.D. Patel, *Synth. Commun.* (2019) 1532-2432.

21. S. Priyarega, J. Haribabu, R. Karvembu, *Inorg. Chim. Acta* **532** (2022).
22. Z. Afrasiabi, E. Sinn, W. Lin, Y. Ma, C. Campana, S. Padhye, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 1526–1531.
23. K. Pičuljan, *Struktura i vodikove veze derivata tiosemikarbazona u otopini*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, 1–11.
24. P. Tepeš, P. Novak, *Kem. Ind.* **57** (2008) 165–173.
25. K. Pičuljan, T. Jednačak, N. Cindro, P. Novak, Osnovni priručnik za rad sa spektrometrom NMR visoke rezolucije, Zagreb, 2016.
26. T. Haselhorst, A. C. Lamerz, M. von Itzstein, *Methods Mol. Biol.* 2009, 375–386.
27. A. Viegas, J. Manso, F. L. Nobrega, E. J. Cabrita, *J. Chem. Educ.* 2011 **88** (7), 990–994.
28. R. Huang, I. K. H. Leung, *Methods Enzymol* **615** (2019) 477–500.
29. A. D. Gossert, W. Jahnke, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **97** (2016) 82–125.
30. T. Sugiki, K. Furuuta, T. Fujiwara, C. Kojima, *Molecules* **23** (2018) 148.
31. C. Dalvit, G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, B. Stockman, *J. Biomol. NMR* **21** (2001) 349–359.
32. T. Jednačak, I. Mikulandra, K. Smokrović, A. Hloušek-Kasun, M. Kapustić, K. Delaš, I. Piantanida, M. Jurković, B. Bertoša, K. Zangger, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* (2023).

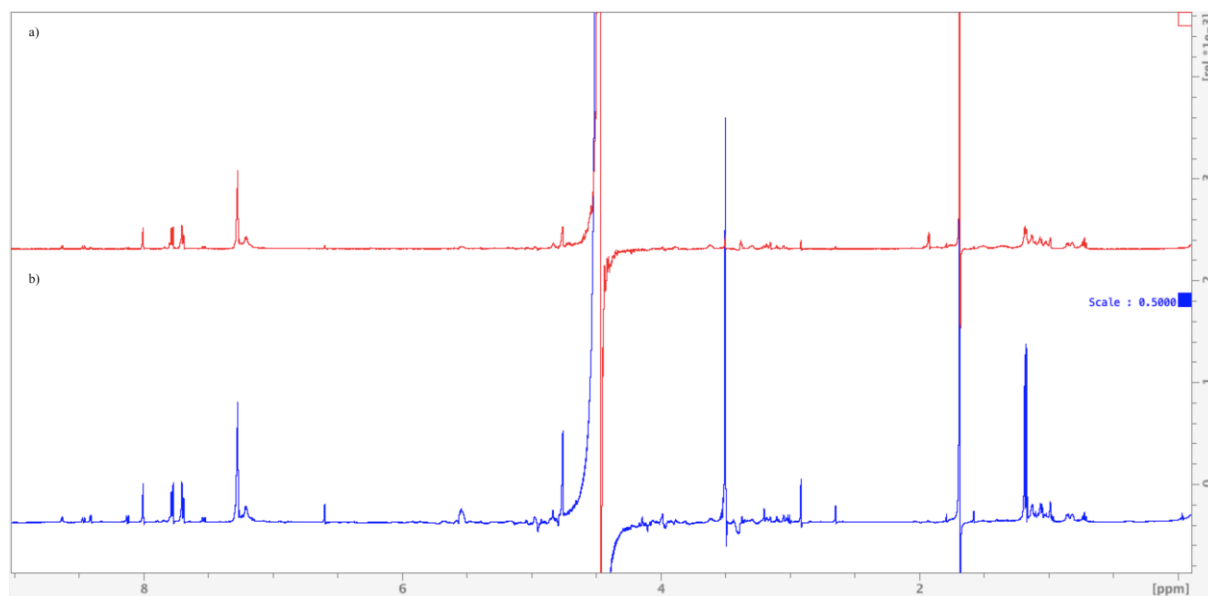
§ 8. DODATAK



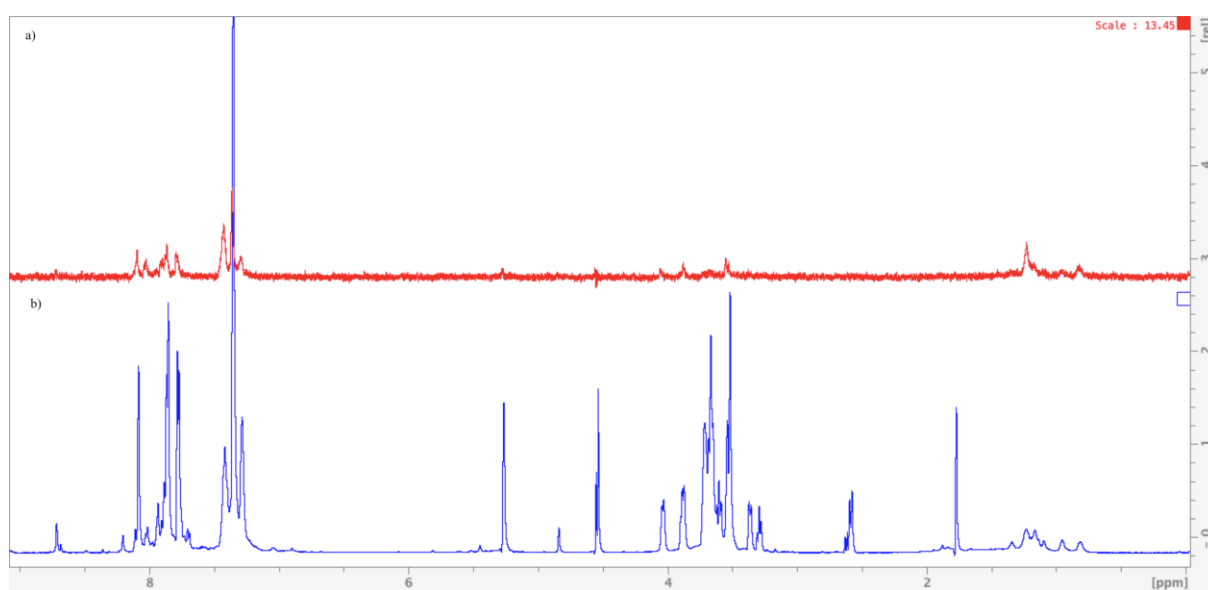
Slika D1. Spektar ^1H NMR spoja 4''-6 prije dodatka ribosoma iz *E. coli* u fosfatnom puferu i DMSO-d_6 pri 298 K



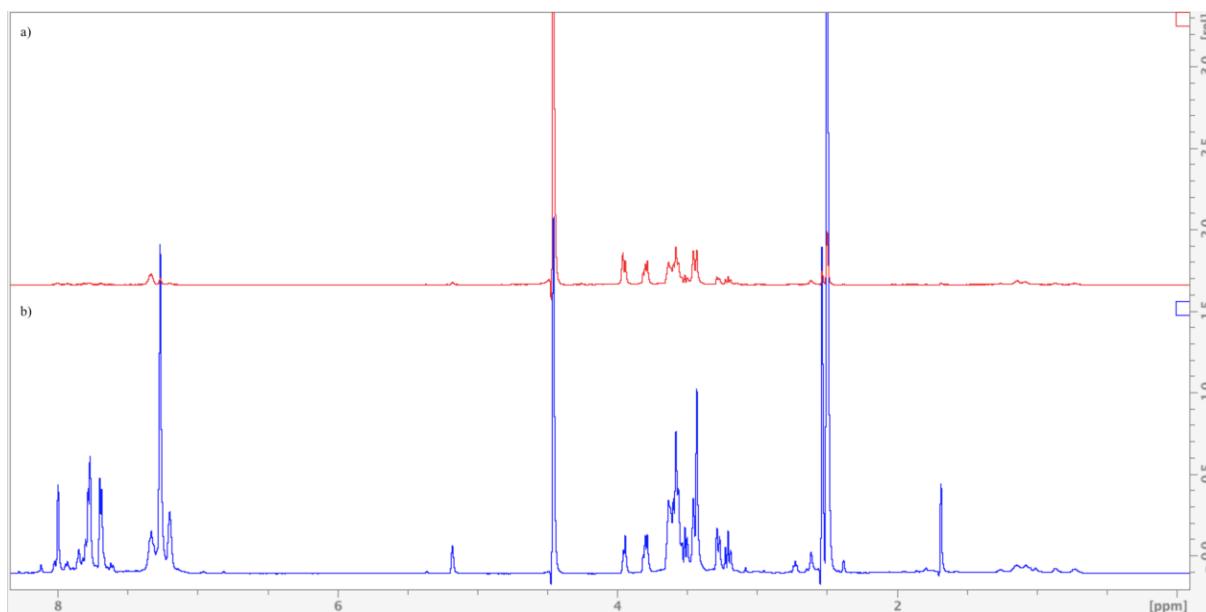
Slika D2. a) Spektar razlike STD spoja 4''-6 nakon dodatka ribosoma pri -0,5 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka ribosoma



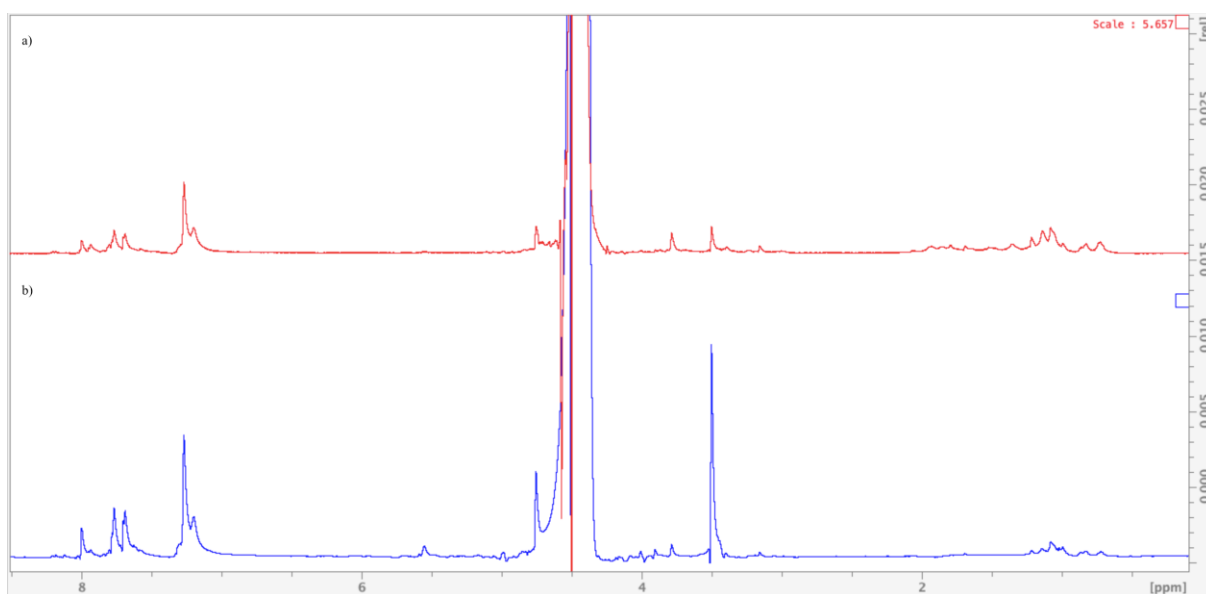
Slika D3. a) Spektar razlike STD spoja 4''-6 nakon dodatka BSA pri -0,5 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka BSA



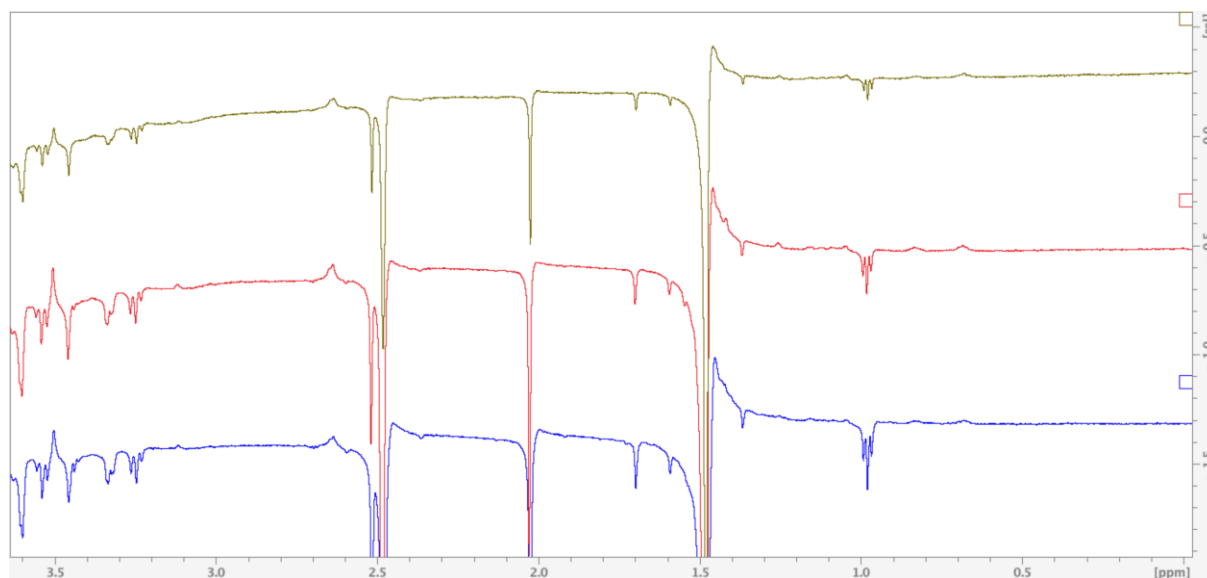
Slika D4. a) Spektar razlike STD spoja M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma pri 8 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka ribosoma



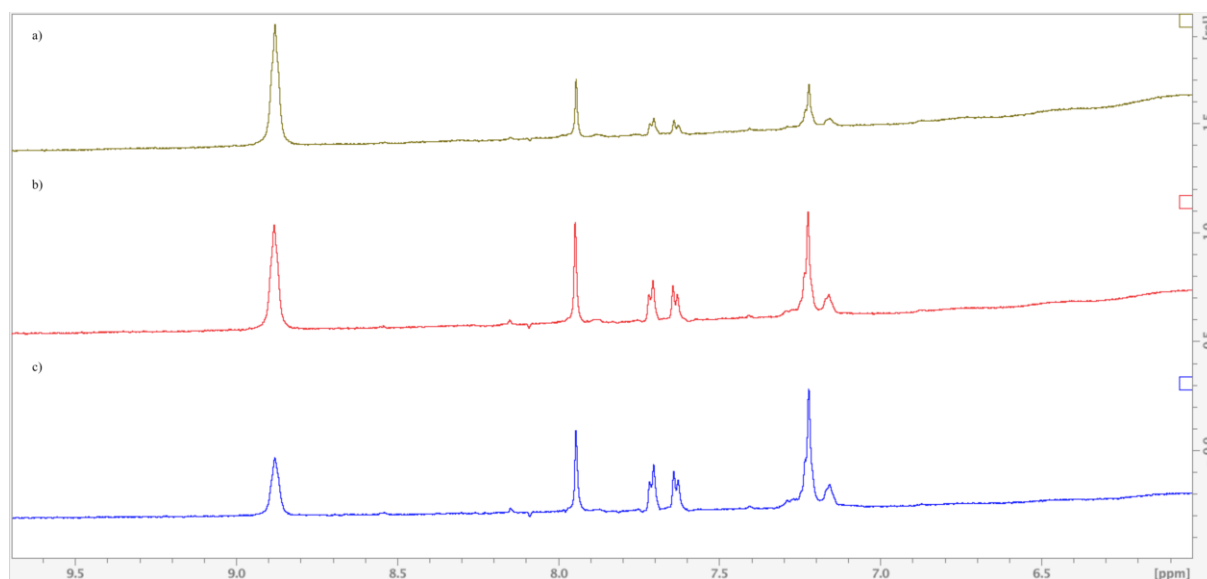
Slika D5. a) Spektar razlike STD spoja M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma pri -0,5 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka ribosoma



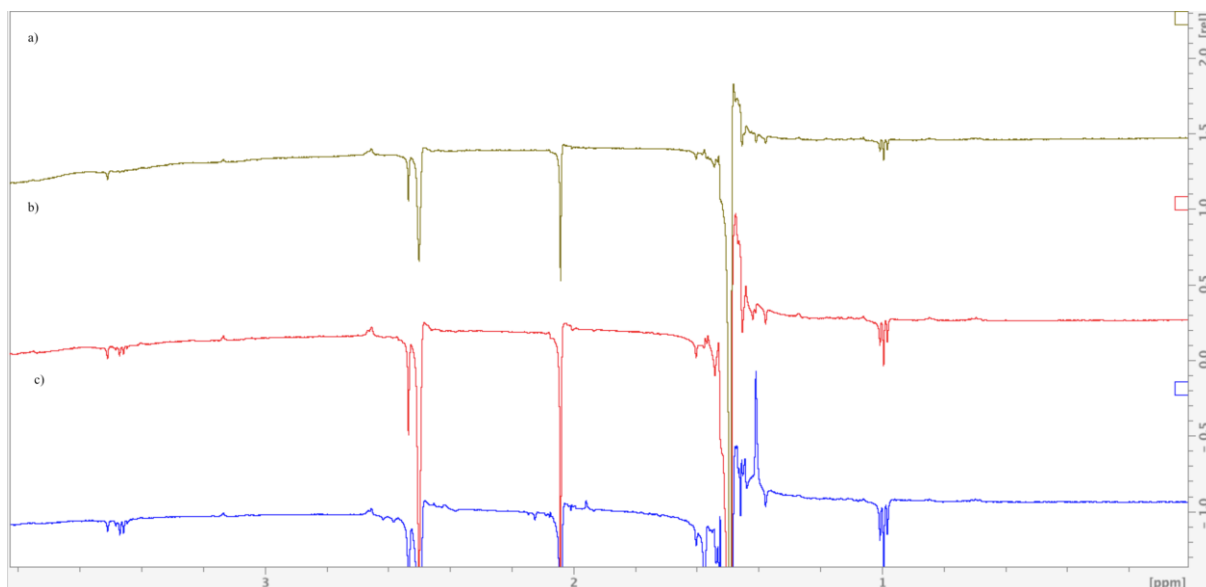
Slika D6. a) Spektar razlike STD spoja M4''-NiP6 nakon dodatka BSA pri -0,5 ppm, b) spektar *off-resonance* pri 50 ppm nakon dodatka BSA



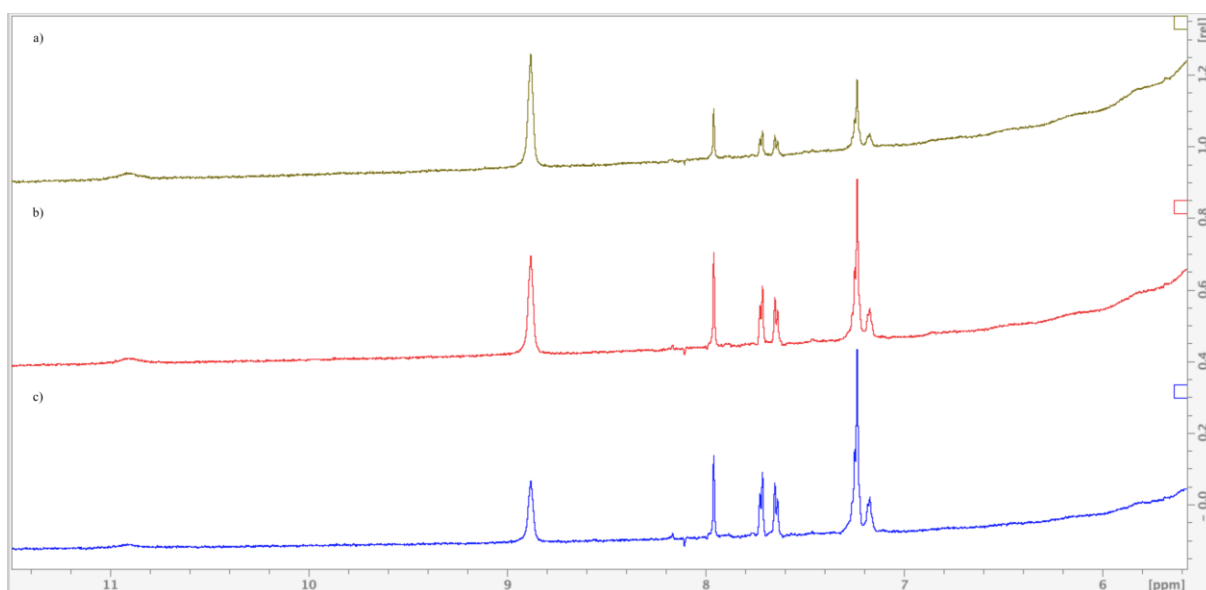
Slika D7. Alifatski dio spektara WaterLOGSY spoja M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma, pri različitim vremenima miješanja: a) 0,25 s, b) 0,75 s i c) 1,7 s



Slika D8. Aromatski dio spektara WaterLOGSY spoja M4''-NiP6 nakon dodatka ribosoma, pri različitim vremenima miješanja: a) 0,25 s, b) 0,75 s i c) 1,7 s



Slika D9. Alifatski dio spektara WaterLOGSY spoja M4''-NiP6 nakon dodatka BSA, pri različitim vremenima miješanja: a) 0,25 s, b) 0,75 s i c) 1,7 s



Slika D10. Aromatski dio spektara WaterLOGSY spoja M4''-NiP6 nakon dodatka BSA, pri različitim vremenima miješanja: a) 0,25 s, b) 0,75 s i c) 1,7 s

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Kristina Delaš

Datum rođenja: 17. veljače 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2003–2011 Osnovna škola Vladimir Nazor, Zagreb

2011–2015 IX. Gimnazija, Zagreb

2016–2020 Preddiplomski studij Kemijski odsjek, Prirodoslovno- matematički fakultet, Sveučilište u Zagreb

2021–2024 Diplomski studij kemije, smjer; analitička i organska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2021–2022 Stručna praksa – Od aromatskih spojeva s dušikom do novih funkcionalnih organskih materijala

Publikacije

1. T. Jednačak, I. Mikulandra, K. Smokrović, A. Hloušek-Kasun, M. Kapustić, K. Delaš, I. Piantanida, M. Jurković, B. Bertoša, K. Zangger, P. Novak, Antimicrobial macrozones interact with biological macromolecules *via* two-site binding mode of action: Fluorimetric, NMR and docking studies, *Bioorg. Chem.* - postupak publiciranja