

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC
Etapa IV, PN-II-PT-PCCA-2011-3.1-1350 AMPLE, 2015

REZUMATUL ETAPEI

COORDONATOR (INFLPR): Analize de spectroscopie vibrationala pentru predictia activitatii EPI a medicamentelor: chinazoline sau fenotiazine.

Solutia de CPZ neiradiata cat si solutiile de CPZ iradiate s-au dovedit a fi candidati buni in inhibarea pompelor de eflux a bacteriilor. Astfel, au fost efectuate teste de sensibilitate *in vitro* ale bacteriilor gram-pozitive (*S. aureus* 6538, *S. aureus* MSSA, *S. aureus* MRSA, *E. faecium* 17-VAR, *E. faecalis* 2921, *B. subtilis* 6633) si gram-negative (*A. baumannii* complex 230, *P. aeruginosa* 27833, *K. pneumoniae* 40, *Ent. cloacae* 56 și *E. coli* 8735) la solutiile de CPZ, avand o concentratie de 2 mg/mL, expuse la radiatie laser emisa la 266 nm pentru diferite intervale de iradiere cu scopul de a determina timpul optim de iradiere pentru care se obtine cea mai mica valoare a concentratiei minime de inhibitie (CMI).

Analizele arată ca:

- în cazul *S. aureus* 6538 timpul optim de iradiere este de 30 min, unde se obține cea mai mică valoare CMI, respectiv 2,58 μg/mL;
- pentru *S. aureus* MSSA este suficientă o iradiere de doar 30 min pentru a obține o activitate antimicrobiană îmbunătățită de până la 16 ori comparativ cu cea a CPZ neiradiat;
- pentru *S. aureus* MRSA la CPZ neiradiat și iradiat timpul optim de iradiere este de 15 min, unde rezultă o valoare CMI de 5,16 μg/mL;
- pentru *E. faecium* 17-VAR (tulpină rezistentă la vancomicină) la o iradiere între 15 și 60 min valoarea CMI obținută scade semnificativ ajungând la 2,58 μg/mL. La timpi de iradiere mai mari, ea crește până la 10,3 μg/mL. Și în acest caz, timpul optim necesar de iradiere a CPZ este de 15 min.
- bacteria *B. subtilis* 6633 s-a dovedit a fi susceptibilă atât la CPZ neiradiat cât și cel iradiat, unde pentru probele iradiate între 15 min și 120 min, valorile CMI au fost de 5,16 μg/mL. Prin urmare, se poate observa o îmbunătățire a activității antimicrobiene de până la 16 ori, iar timpul optim de iradiere și în acest caz este de 15 min;
- în cazul *E. faecalis* 2921 timpul optim de expunere a CPZ la un fascicul laser emis la 266 nm cu scopul de a obține efectul antimicrobian este de 15 min.

Testele de susceptibilitate a bacteriilor gram-negative la CPZ neiradiat și iradiat sugerează o acțiune antimicrobiană mai mică comparativ cu cazul bacteriilor gram-pozitive si anume:

- pentru *A. baumannii* complex 230 valoarea CMI cea mai mică este obținută pentru timpii de iradiere de 15, 30 și 60 min, fiind 5,16 μg/mL. În urma analizei, se poate spune că după 120 min de iradiere eficiența compusului scade, timpul optim de iradiere fiind de 15 min;
 - în cazul tulpinii *P. aeruginosa* 27833 nu se poate observă nicio îmbunătățire a activității CPZ iradiat comparativ cu cel neiradiat;
 - tulpina *K. pneumoniae* 40 s-a dovedit a fi rezistentă la probele iradiate;
 - analiza activitatii antimicrobiene a CPZ neiradiat/iradiat timpul optim de iradiere a probei este de 15 min.

În concluzie, timpii optimi de iradiere a solutiei de CPZ pentru a obtine cel mai bun efect antimicrobian sunt de 15 min pentru *S. aureus* MRSA, *E. faecalis* 2921, *B. subtilis* 6633, *E. faecium* 17-VAR, *A. baumannii* complex 230 și *E. coli* 8735 si de 30 min pentru *S. aureus* 6538 si *S. aureus* MSSA.

În urma analizei LC-TOF/MS, din cromatograma totala de ioni s-au extras concentratiile procentuale ale foto-produsilor generati in urma iradierii timp de 15 si 30 min, dinamica distributiei acestora fiind prezentata in Figura 1.

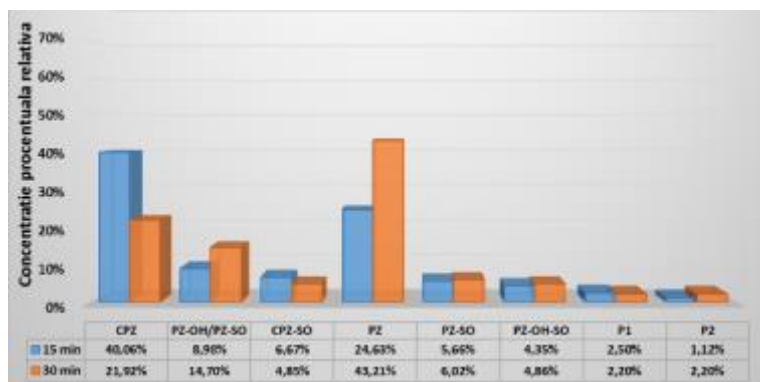


Figura 1: Dinamica distributiei concentratiei procentuale relative a CPZ si a foto-produsilor in urma expunerii CPZ la radiatie laser timp de 1 min, 15 min si 30 min

Pentru toate microorganismele studiate, activitatea antibacteriana a probelor iradiate este mai pronuntata decat in cazul CPZ neiradiat, foto-produsii generati actionand individual sau intr-un mod sinergic. Astfel s-a testat un produs disponibil comercial, PZ (Sigma-Aldrich, 98%), pe aceleasi tulpini de bacterii.

In cazul activitatii *in vitro* a 2 mg/mL de PZ, valorile CMI obtinute arata o sensibilitate a bacteriilor la acest medicament mai mica decat in cazul CPZ neiradiat si iradiat. Comparativ cu CPZ neiradiat, valorile CMI obtinute pentru PZ sunt cu mult mai mari pentru majoritatea bacteriilor, spre exemplu pentru *S. aureus* 6538 CMI_{CPZ} este de 2,58 $\mu\text{g/mL}$ pe cand CMI_{PZ} este de 165 $\mu\text{g/mL}$.

Solutiile de CPZ neiradiate si iradiate au fost analizate prin spectroscopie FTIR si au fost identificate vibratiile diferitelor legaturi chimice corespunzatoare moleculei de CPZ. In urma analizei CMI s-a demonstrat ca solutiile iradiate sunt mai eficiente in distrugerea bacteriilor comparativ cu solutia de CPZ neiradiata. Astfel s-au comparat spectrele IR ale solutiilor iradiate pentru intervale de timp de expunere intre 1 min si 240 min cu cel al solutiei de CPZ neiradiate, pentru a se obtine un model de predictibilitate a activitatii EPI a unui medicament utilizand spectroscopia FTIR. Pentru solutia de CPZ neiradiata spectrul IR este caracterizat atat de vibratii de alungire a inelului aromatic $C=C-C$ (1590 si 1566 cm^{-1}), de vibratii de deformare in plan-forfecare a $C-H$ (950-1150 cm^{-1}), cat si de deformari in plan-balans a celor 4 atomi de H adiacenti inelului (830-880 cm^{-1}).

Ca urmare a interactiei radiatiei laser UV cu solutiile de CPZ, pentru diferiti timpi de expunere, se poate observa ca exista procese competitive intre transformarile fotochimice ce au loc si emisia de fluorescenta, generarea de oxigen singlet, modificarile conformationale, transferul de energie si/sau conversia interna.

Spectrele IR ale solutiilor de CPZ neiradiate si iradiate intre 1-240 min sunt prezentate in Figura 2, unde se pot observa diferentele dintre spectrul probei neiradiate si a celor ale probelor expuse la radiatia laser UV.

Comparand spectrul IR al solutiei de CPZ neiradiate si cel al solutiei de CPZ iradiate 1 min, nu se pot observa modificari ale benzilor in cazul probei expuse la radiatie, acest fapt putand fi corelat si cu activitatea antibacteriana care nu sufera modificari majore comparativ cu proba neiradiata.

In cazul solutiei de CPZ dizolvate in apa ultrapura, la o concentratie de 2 mg/mL si iradiata 240 min, apare o noua banda la 1265 cm^{-1} , atribuita vibratiei de intindere a legaturii $C-O$ din cadrul unei grupari fenol. Acest lucru indica formarea unui foto-produs ce cuprinde o grupare hidroxil. Banda de la 1085 cm^{-1} se datoreaza vibratiei de intindere a legaturii $S-O$ din cadrul unei grupari sulfoxid, indicand generarea unor forme oxidative a foto-produsilor. Banda de la 804 cm^{-1} desemnata vibratiei legaturii $C-Cl$ nu se mai regaseste in spectrul CPZ iradiat 240 min, acest lucru sugerand formarea PZ in timpul iradierii. Deplasarea de 6 cm^{-1} catre numere de unda mai mari se datoreaza disparitiei CPZ din proba si formarii de foto-produsi.

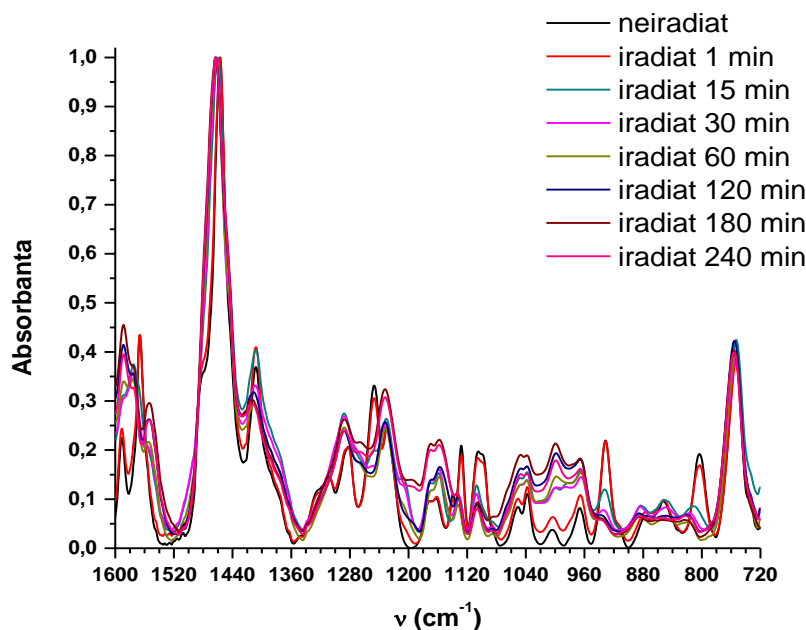


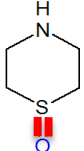
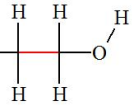
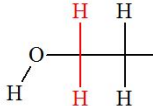
Figura 2: Spectrele IR ale soluțiilor de CPZ neiradiate și iradiate între 1 – 240 min, în domeniul 1600-720 cm^{-1}

În urma analizei activității antibacteriene prezentată mai sus, au fost comparate spectrele IR ale soluțiilor iradiate 15 min sau 30 min cu cel al soluției de CPZ neiradiate. Se pot observa noi benzi atât pentru soluția de CPZ iradiată 15 min la 1206 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 986 cm^{-1} și la 816 cm^{-1} , cât și pentru cea iradiată 30 min la 1248 cm^{-1} , 1207 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 983 cm^{-1} și la 810 cm^{-1} .

Ruperea legăturii C-Cl este demonstrată de: * dispariția benzii de la 804 cm^{-1} responsabilă de vibrația de alungire a legăturii C-Cl și * scăderea intensității benzii cu maxim la 931 cm^{-1} responsabilă de vibrația de deformare în afara planului-balans a atomului izolat de H adiacent inelului aromatic, amandoua sugerând fotodegradarea CPZ în fotoprodusi activi din punct de vedere biologic. Acești fotoprodusi, responsabili de efectul antimicrobian îmbunătățit, pot fi determinați în urma analizei FTIR. Astfel, pentru probele iradiate 15 min și 30 min în Tabel 1 sunt prezentate vibrațiile legăturilor caracteristice benzilor formate.

Tabel 1: Tipul vibrațiilor legăturilor corespunzătoare soluțiilor de CPZ iradiate 15 min și 30 min, în urma analizei FTIR

ν (cm^{-1})		Tip de vibrație	Fragment
CPZ iradiat 15 min	CPZ iradiat 30 min		
-	1248	vibrație de alungire C-O (grupare fenol în cadrul inelului aromatic)	
1206	1207	vibrație de alungire C-O (grupare fenol în cadrul inelului aromatic)	

1084	1084	vibratie de intindere a legaturii S–O (grupare sulfoxid in cadrul inelului aromatic)	
986	983	vibratie de alungire C-C (grupare fenol in cadrul unui compus alifatic)	
816	810	vibratie de deformare în afara planului-balans CH ₂ (grupare fenol in cadrul unui compus alifatic)	

Prin urmare, din analiza FTIR rezulta ca fotoprodusii generati in urma expunerii la radiatie UV timp de 15 sau 30 min sunt produsi sulfoxidici si hidroxilici. Banda de la 1084 cm⁻¹ se regaseste in spectrele IR a tuturor solutiilor iradiate, acesti compusi neparticipand la imbunatatirea efectului antimicrobian al probelor, inasa benzile cu maxime la 986 cm⁻¹, respectiv 983 cm⁻¹ se regasesc doar in spectrele probelor iradiate 15 min, respectiv 30 min.

In esenta, modificarile benzilor observate in spectrele IR sugereaza foto-degradarea compusului parental CPZ si generarea de foto-produsi ce contin grupari hidroxil si sulfoxid. Identificarea in spectrele IR a compusilor hidroxilici caracterizati de vibratii in jurul valorilor de 986 si 1207 cm⁻¹ poate fi o metoda de precizie a activitatii EPI a solutiilor testate.

PARTENER 1 (IFIN – HH): Simularea interactiei medicamentelor cu pompele de eflux bacteriene - faza a 2-a

In cea de-a patra etapa a fost realizata Activitatea : "*Implementarea algoritmilor si metodelor VLS, efectuarea de simulari a proceselor de interactie pe platforma HPC utilizand softul de modelare moleculara pe chinazoline sau fenotiazine, efectuarea testelor VLS si asigurarea accesului la softul de calcul de structuri electronice si moleculare*".

Scopul principal l-a constituit aplicarea acestor metode pentru studiul proceselor de interactie a derivatilor de chinazoline si fenotiazine cu modelului structural al pompei de eflux NorA din *S. Aureus*, prin intermediul calculelor de docking si al simularilor de dinamica moleculara.

Desi modelul pompei de eflux NorA din *S. aureus* a fost construit pe baza unor structuri experimentale cu grad scazut de omologie de secventa, atat rezultatele de dinamica moleculara cat si rezultatele de validare a structurii NorA cu ajutorul liganzilor (derivati chinolinici) cu activitate experimentală cunoscuta prin metode avansate (FEP si FMO), par sa indice ca acesta structura poate fi utilizata pentru identificarea de noi inhibitori (EPI).

Daca in cazul derivatilor chinazolinici s-a identificat in etapa precedenta un mod plauzibil de legare la pompa de eflux – situsul hidrofobic dintre lanturile alfa-helix 1, 2, 3 si 4 – modul de interactiune al fenotiazinelor nu este inca elucidat. Conform rezultatelor publicate in literatura de specialitate, fenotiazinele ar actiona atat direct asupra NorA cat si indirect prin perturbarea gradientului protonic transmembrantar – spre dozebire de reserpina care actioneaza numai asupra NorA. In docking, fenotiazina se leaga atat la situsul 1 cat si la situsul 2, dar aceste conformatii nu se pastreaza nici macar la minimizarea energetica, iar in cursul dinamicii moleculare sunt extrase complet sau partial din respectivele situsuri, fara sa formeze legaturi foarte stabile in alta regiune.

Interactiile derivatilor chinazolinici si fenotiazinici si a referintelor de legare (reserpina, derivati chinolinici, etc.) in situsul RBS1 al NorA au fost investigate pe durata dinamicii moleculare NPT (MD) utilizand codul Desmond.

Rezultatele de modelare moleculara avansata indica in cazul referintelor de legare la NorA (chinoline), asocierea gruparii protonabile cu activitatea de inhibare, in timp ce compusii inactivi se protonaza doar la valori foarte scazute sau foarte ridicate de pH.

Din simularea MD post-docking a rezultat ca inhibitorii chinolinici ai NorA realizeaza o legatura de hidrogen suplimentara puternica si foarte stabila intre o grupare amino protonabila si GLU222 (situat la exteriorul situsului). Aceasta legatura ar putea stabiliza compusii in situs sau ar putea afecta mecanismul de inchidere/deschidere a pompei NorA.

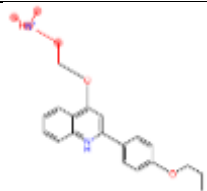
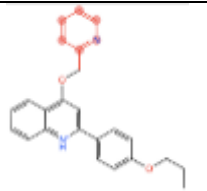
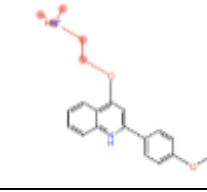
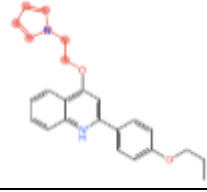
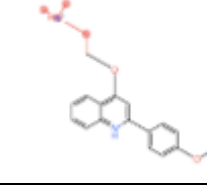
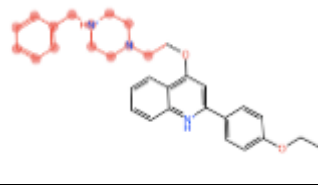
In cadrul simularilor de docking s-a constatat ca fenotiazinele se leaga atat la situsul 1 si la situsul 2, dar aceste conformatii nu se pastreaza in cursul dinamicii moleculare in forma deprotonata (nu formeaza legaturi foarte stabile in situs daca gruparea dimetilamino este deprotonata). Gruparile sulfoxid si hidroxid par sa contribuie favorabil la stabilizarea in situs si cresterea afinitatii de legare.

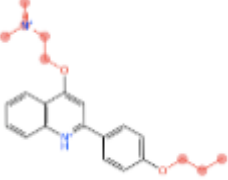
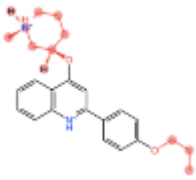
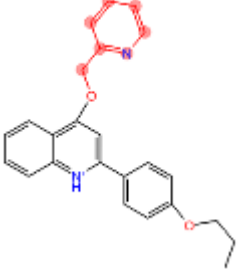
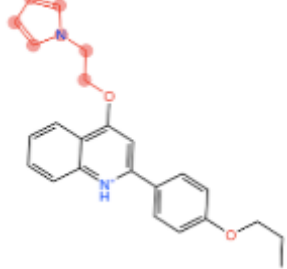
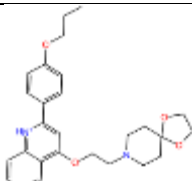
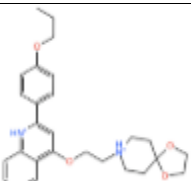
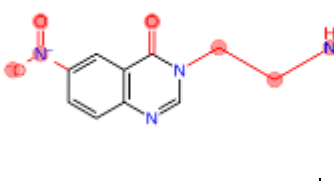
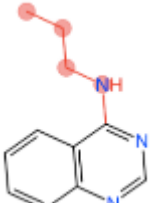
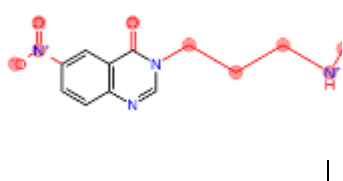
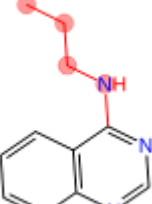
S-au estimat diferenta relativa de energie libera de legare pentru compusi diferiti din aceeasi clasa cu ajutorul metodei FEP/REST Desmond (free energy perturbation/replica exchange with solute tempering)

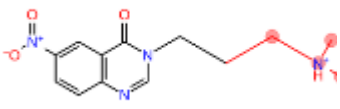
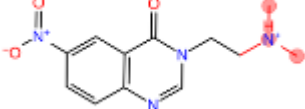
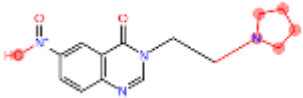
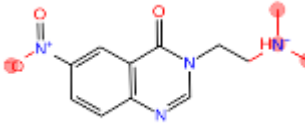
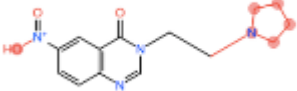
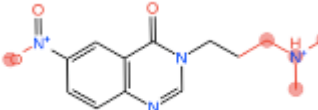
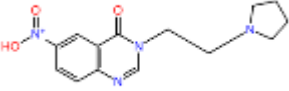
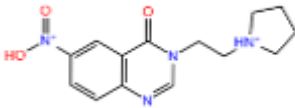
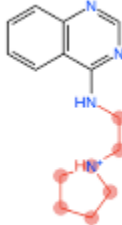
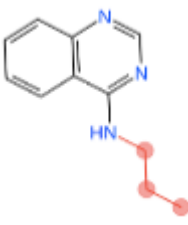
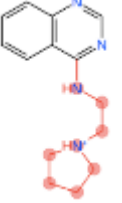
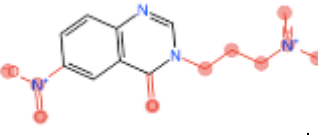
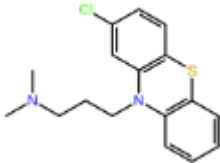
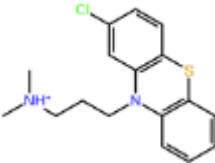
Pentru o cuantificare mai precisa (la nivel de reziduu sau grupare) si pentru eliminarea incertitudinilor legate de parametrizarea liganzilor s-a folosit metoda FMO (Fragment Molecular Orbital). Rezultatele au indicat contributia energetica (electrostatica) puternica a legaturilor de hidrogen realizate cu ARG98/GLU82 si GLU222 in cazul compusilor activi, precum si contributia semnificativa a interactiilor hidrofobice identificabile (stacabile de timp π -cation sau π - π) cu reziduurile din situs.

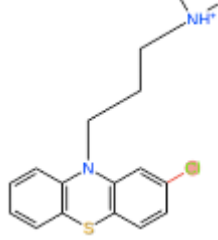
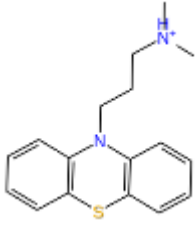
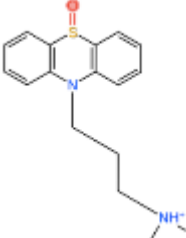
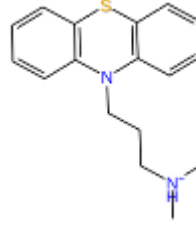
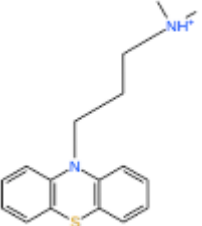
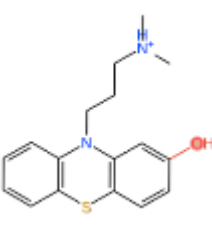
Rezultate FMO evidentiaza cresterea afinitatii de legare a PZ_OH_HN⁺ si PZ_SO_OH_HN⁺ comparativ cu molecula de promazina. De asemenea chinazolinele BG1188 si BG1189 prezinta afinitate de legare mult mai mare decat chinazoline BG1162.

Table 2: Rezultatele FEP de energie libera de legare relativa ($\Delta\Delta G$)

Ligand 1	Ligand 2	$\Delta\Delta G$
		Cresterea energiei de legare (7.05 +/- 0.13 kcal/mol)
3b activ NorA IC50 9.9 uM	3j inactiv NorA IC50 N/A	
		Cresterea energiei de legare (6.57 +/- 0.27 kcal/mol)
3b ACTIV NorA IC50 9.9 uM	3c INACTIV NorA IC50 N/A	
		Cresterea energiei de legare (1.64 +/- 0.36 kcal/mol)
3b ACTIV NorA IC50 9.9 uM	3s ACTIV NorA IC50 3.8 uM	

		Cresterea energiei de legare (0.70 +/- 0.38 kcal/mol)
3b ACTIV NorA IC50 9.9 uM	3f ACTIV NorA IC50 8 uM	
		Cresterea energiei de legare (1.34 +/- 0.13 kcal/mol)
3j inactiv NorA IC50 N/A	3c inactiv NorA IC50 N/A	
		Scaderea energiei de legare (-3.35 +/- 0.10 kcal/mol)
3x_grupare amino deprotonata IC50 N/A	3x activ NorA IC50 8.5 uM	
		Cresterea energiei de legare (8.74 +/- 0.22 kcal/mol)
BG1188_HN+	BG1162	
		Cresterea energiei de legare (9.46 +/- 0.25 kcal/mol)
BG1189_HN+	BG1162	

		Scaderea energiei de legare (-1.07 +/- 0.29 kcal/mol)
BG1189_HN+	BG1188_HN+	
		Scaderea energiei de legare (-1.60 +/- 0.35 kcal/mol)
BG1190	BG1188_HN+	
		Scaderea energiei de legare (-4.69 +/- 0.35 kcal/mol)
BG1190	BG1189_HN+	
		Scaderea energiei de legare (-5.10 +/- 0.29 kcal/mol)
BG1190	BG1190_HN+	
		Cresterea energiei de legare (9.65 +/- 0.26 kcal/mol)
BG1164_HN+	BG1162	
		Scaderea energiei de legare (-0.66 +/- 0.38 kcal/mol)
BG1164_HN+	BG1189_HN+	
		Scaderea energiei de legare (-4.05 +/- 0.21 kcal/mol)
CPZ	CPZ_HN+	

		Cresterea energiei de legare (1.01+/- 0.03 kcal/mol)
CPZ_HN+	PZ_HN+	
		Scaderea energiei de legare (-1.23 +/- 0.07 kcal/mol)
PZ_SO_HN+	PZ_HN+	
		Cresterea energiei de legare cu (-0.16 +/- 0.06 kcal/mol)
PZ_HN+	PZ_OH_HN+	

PARTENER 2 (UMF “Carol Davila” Bucuresti): Aplicarea chinazolinelor sau fenotiazinelor pe ochi de iepuri de laborator infectati cu tulpini de bacterii gram pozitive si sintetizarea rezultatelor.

Activitatea in 2015 a fost dedicata subiectului: Teste de validare pe modele de animale/animale de laborator a activitatii chinazolinelor sau fenotiazinelor cu efect EPI prezis, iradiate si neiradiate. S-au obtinut pseudotumorile limbice, prin metoda Schmidt-Erfurth, care prevede inserarea unui fir (in acest caz, polipropilena 6.0) la nivelul limbului sclera-cornean (Figura 3a). Pseudotumorile au fost obtinute la 5 zile dupa insertia firului. Apoi, s-a injectat *Staphylococcus aureus* meticilino-rezistent (tulpina 6538). Dupa 3 zile se remarca macroscopic un proces inflamator marcat, cu neovase la nivelul corneei si conjunctivei (Figura 3b).

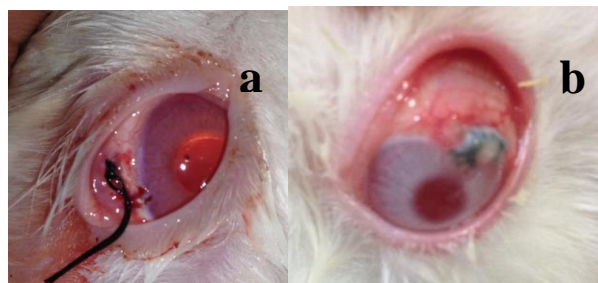


Figura 3: a) Inserarea firului de polipropilena la nivelul limbului sclero-cornean in cazul inducerii de pseudotumori limbice; b) Proces inflamator ca urmare a infectarii cu *Staphylococcus aureus* 6538. Imagini/fotografii cu marire 1x.

La 5 zile dup injectarea stafilococului, a fost efectuat tratamentul ochilor dupa cum urmeaza: Iepurele nr. 1 – infectat, dar nu a fost tratat; Iepurele nr. 2 – Infectat, tratat cu CPZ neiradiata; Iepurele

nr. 3 - Infectat, tratat cu TZ neiradiata; Iepure nr. 4 - Infectat, tratat cu CPZ 2 mg/ml, iradiata in prealabil la 266 nm, 60 minute, ED50 18.53 µg/ml; Iepurele nr. 5 – Infectat, tratat cu CPZ 2mg/ml, iradiata in prealabil la 266nm, 60 minute, CMI 2.6 µg/ml; Iepurele nr. 6 – Infectat, tratat cu TZ 2mg/ml, iradiata la 266 nm, 120 minute, ED50 16.9 µg/ml; Iepurele nr. 7; iepurele nr. 8 - Infectat, tratat cu TZ 2mg/ml, iradiata la 266 nm, 120 minute, CMI 2.6 µg/ml.

La 5 zile dupa tratament, ochii au fost supusi examenului anatomo-patologic iar concluziile acestuia sunt urmatoarele: *Iepurele 1- prezinta inflamatia cea mai pregnantata dintre cei 8 iepuri; *Iepurii 2 si 3 – prezinta leziuni inflamatorii minime, cu caracter rezidual;

*Iepurii 5 si 7 au prezentat leziuni inflamatorii usoare; *Iepurii 4 si 6 au prezentat leziuni inflamatorii moderate, cu rare PMN, inflamatia fiind mai abundenta la iepurele nr 4.

Concluzii generale si perspective

Rezultatele obtinute in 2015 in cadrul proiectului constituie premise bune pentru finalizarea proiectului in 2016, asigurand din punct de vedere stiintific baza de plecare necesara finalizarii proiectului. In 2016 se are in vedere modelarea moleculara a interactiei dintre medicamentele selectate expuse la radiatia laser si tinte biologice cuplata cu dezvoltarea corespunzatoare de algoritmi VLS si cu evaluarea metodelor VLS dezvoltate. Se va urmari si proiectarea de metode si algoritmi pentru predictia interactiilor moleculare ale medicamentelor cu pompe de eflux bacteriene corelata cu rezultatele aplicarii medicamentelor expuse la radiatie laser pe tesuturi pseudotumorale produse pe ochi de iepure si infectate cu diferite culturi de bacterii.