

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

Etapa a V-a, a proiectului PN-II-PT-PCCA-2011-3.1-1350, Nr. 85/2012

Modelarea si simularea activitatii pompelor de eflux bacteriene prin metode laser avansate (AMPLE)

Titlul general al etapei este „Validarea interactiilor dintre medicament si agenti patogeni prezise”, iar activitatile abordate de fiecare partener au avut in vedere atingerea obiectivelor etapei.

REZULTATE PRECONIZATE:

Metoda de selectie a medicamentelor cu efect EPI si sintetizarea mecanismelor de interactie a acestora cu bacteriile tinta in culturi si in organisme ale animalelor de laborator.

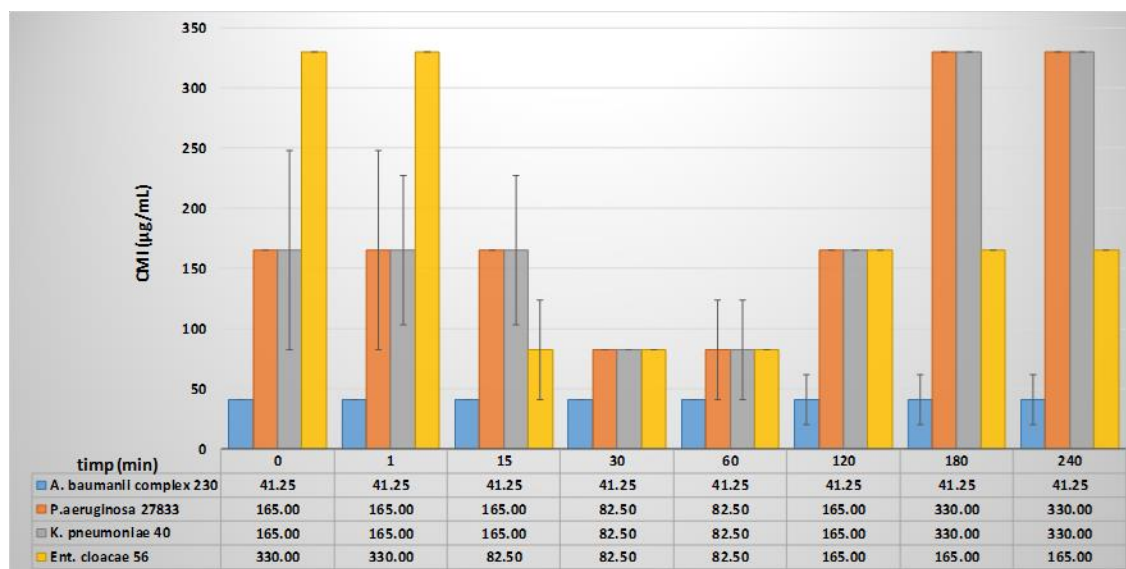
Articol pe tema predictiei efectelor EPI ale medicamentelor; capitol de carte; comunicari la conferinte nationale/internationale.

REZUMATUL ETAPEI/ACTIVITATII:

Unitatea coordonatoare, INFLPR, a abordat subiectul: Modelarea moleculara a interactiei dintre medicamente expuse la radiatia laser si tinte biologice; dezvoltarea de algoritmi VLS si evaluarea metodelor VLS dezvoltate, proiectarea de metode si algoritmi pentru predictia interactiilor moleculare ale medicamentelor cu pompe de eflux bacteriene. Analiza spectrelor IR si Raman ale medicamentelor cu efect EPI prezis inainte si dupa expunerea la fascicule laser; finisarea metodelor de analiza a compusilor rezultati dupa iradiere, participarea la testele efectuate de partenerul 2, analiza si elaborarea concluziilor finale privind rezultatele cercetarii. Elaborarea raportului final al proiectului.

Compusii destinati studiului in aceasta etapa au fost: derivati de fenotiazina – CPZ si TZ si un derivat de hidantoina denumit generic SZ-2. Solutii ale acestora in apa ultra-pura sau DMSO au fost expuse la radiatie laser, iar comportarea lor in aceste conditii a fost evaluata prin metode spectroscopice, inclusiv FTIR si Raman. S-au efectuat modelari moleculare ale compusilor de mai sus folosind programele Gaussian 09 si GaussView 5.0. S-au comparat rezultatele obtinute experimental cu cele calculate.

A fost determinata sensibilitatea unor microorganisme la solutiile de TZ iradiate si a fost realizat un screening al activitatii antimicrobiene al CPZ si TZ. Analiza utilizand citometria in flux a aratat ca mecanismul principal al activitatii antimicrobiene a solutiilor iradiate este reprezentat de inducerea de leziuni la nivelul membranelor celulare care afecteaza permeabilitatea selectiva a acestora pentru probele de CPZ neiradiat (*S.aureus* 23) si iradiat 30 min (*S.aureus* 23 si *S.aureus* 27) si de TZ neiradiat si iradiat 180 min (*S.aureus* 27). In cazul detectarii efluxului pompelor bacteriene activate, singura proba care actioneaza ca agent de inhibare a pompelor de eflux este TZ iradiat 180 min prin modularea activitatii pompelor de eflux a tulpinii *S. aureus* 27.



Studiile spectrale efectuate confirma o atasare a moleculei de SZ-2 la fragmente de ADN, pentru care clarificarea mecanismului de functionare necesita investigatii suplimentare. Valoarea constantei de asociere este totusi mult inferioara acelora ale unor medicamente antitumorale si anti-infecioase utilizate deja in practica medicala, cum sunt epirubicin sau benzimidazol.

Se demonstreaza producerea de oxigen singlet in cazul SZ-2, ceea ce recomanda compusul in procedurile de terapie fotodinamica.

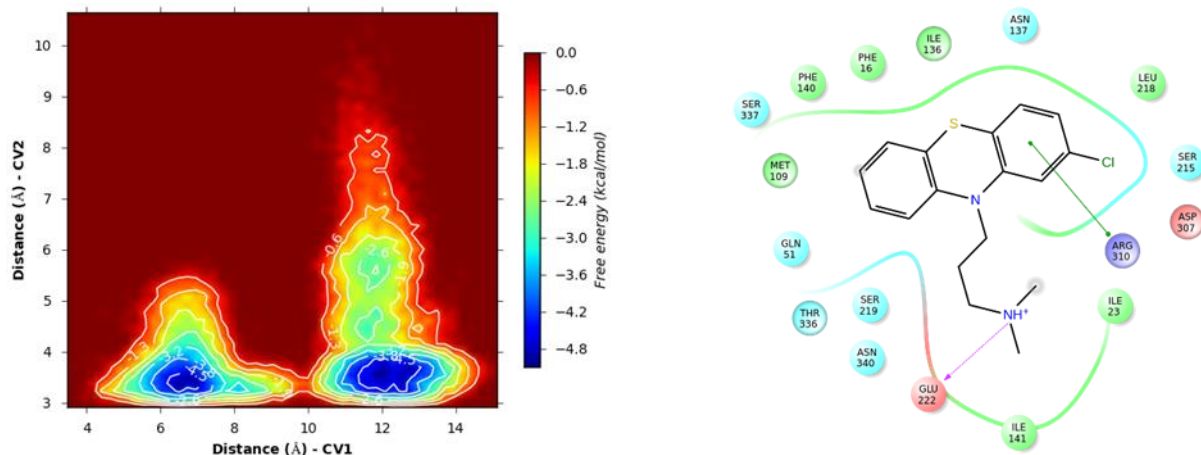
Unitatea Partener 1, IFIN – HH a abordat subiectul: Modelarea moleculara a interactiei dintre medicamente expuse la radiatia laser si tinte biologice; dezvoltarea de algoritmi VLS si evaluarea metodelor VLS dezvoltate, proiectarea de metode si algoritmi pentru predictia interactiilor moleculare ale medicamentelor cu pompe de eflux bacteriene. Rafinarea simularii VLS din feedbackul rezultat in urma experimentelor partenerilor.

Conform planului de realizare al proiectului, in cea de-a cincea etapa DFCTI/IFIN-HH a realizat, in cadrul Activitatii V.2, rafinarea simularii de screening virtual a liganzilor (VLS) relevanta pentru proiect si mentinerea disponibilitatii serviciilor de calcul furnizate de platforma HPC pentru modelarea structurilor electronice si moleculare.

Simulari VLS complementare de metadinamica moleculara au condus la validarea in silico a modelului de predictie a activitatii EPI a derivatelor de chinazoline si fenotiazine pentru proteina NorA, care a fost propus in etapa precedenta.

Simularile de metadinamica au fost efectuate cu doua variabile colective, care permit esantionarea derivatilor activi si inactivi de chinoline, fenotiazine si chinazoline, in interiorul si in jurul situsului de legare a modelului pompei de eflux NorA. A fost simulata metadinamica si au fost analizate rezultatele pentru compusii chinolinici 3b, 3h, 3w, sulfoxid-clorpromazina, clorpromazina,

sulfoxid-hidroxi-promazina, sulfoxid-promazina, hidroxi-promazina, si derivatii chinazolinici BG1188, BG1190, BG1189.



Rezultatele simularilor confirma validitatea modelului propus in etapa anterioara pentru mecanismul de inhibare al pompei de eflux al proteinei NorA. Totodata, se sustine necesitatea validarii experimentale a rezultatelor pentru a confirma actiunea directa a compusilor fenotiazinici si chinazolinici asupra NorA in vitro. In acest scop se propune investigarea experimentală a inhibitei efluxului de bromura de etidiu, pe tulpini de *S. aureus* care supraexprima pompa de eflux NorA e.g SA-1199B si pe o tulpina care prezinta o deficiente de exprimare a acestei pompe de eflux, de exemplu SA-K1902.

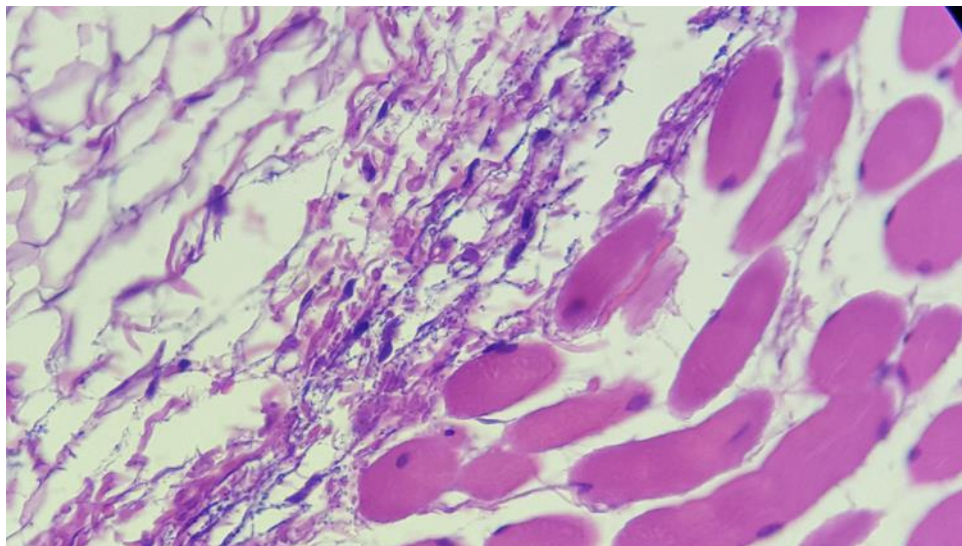
Rezultatele studiului sunt cuprinse intr-un articol aflat in stadiu de finalizare care va fi trimis spre publicare intr-o revista ISI cu profil de modelare moleculara.

Unitatea Partener 2, Universitatea de Medicina si Farmacie “Carol Davila” Bucuresti, a abordat subiectul general: Dezvoltarea testelor EPI de baza (MIC, QS) pentru tulpinile de bacterii studiate: *S aureus*, PA01, PA14, SA, KP. Testarea produsilor cu potential efect EPI asupra ochilor de iepuri de laborator infectati cu bacterii de tulpini rezistente la tratament cu antibiotice si efectuarea de diagnostice diferentiale privind efectele obtinute.

Au fost efectuate studii asupra unui set de 10 iepuri de laborator pentru care au fost produse pseudotumori pe ochi prin metoda Schmidt – Erfurth descrisa in fazele anterioare ale proiectului. Pseudotumorile au fost infectate cu bacteria *S. aureus* 23 care este o tulpina rezistenta la quinolone prin mecanisme legate de pompele de eflux si care a fost studiata din punct de vedere microbiologic si recomandata de P1 pentru aplicatii pe animale de laborator.

Dupa un interval optim de dezvoltare a tesuturilor pseudotumorale, ochii de iepure au fost tratati cu solutii de CPZ in apa la diferite concentratii originare din 2 mg/mL, solutiile fiind expuse intervale de timp de 15 min sau 60 min la radiatie laser emisa in ultraviolet la 266 nm. Ca martor, a fost considerat ochiul de iepure tratat cu CPZ neiradiat, solutia utilizata la o concentratie diferita de cele ale solutiilor expuse la UV, plecand de la concentratia de 2 mg/mL care a fost iradiata.

Concentrațiile folosite la tratamente au fost cele minime inhibitorii (CMI) determinate de CO, după cum urmează: (i) pentru CPZ neiradiat, 165 $\mu\text{g/mL}$; (ii) pentru CPZ iradiat 15 minute, 20.7 $\mu\text{g/mL}$; (iii) pentru CPZ iradiat 60 min 10.4 $\mu\text{g/mL}$.



Tesut tratat cu CPZ la concentrația 2 mg/mL (concentrație de lucru 10.4 $\mu\text{g/mL}$) iradiată 60 minute (secțiune de la nivelul pseudotumorii); infiltrat inflamator în cantitate net mai mare decât în cazul probelor de țesut tratat cu CPZ neiradiată; țesut de tip granulomatos în cantitate moderată, dar mai accentuat decât în cazul primelor trei probe de țesut. Rare macrofage. Mărire 200x.

Rezultatele tratamentelor scot în evidență faptul că în cazul bacteriei gram-pozitive *S. aureus* 23, CPZ iradiat, indiferent de concentrație și de timpii de expunere la fasciculul laser UV, nu este eficient în tratarea țesuturilor pseudotumorale produse pe ochi de iepure și infectate cu această bacterie. CPZ martor neiradiat apare ca mai potrivit pentru aplicație decât CPZ iradiat, spre deosebire de cazul *S. aureus* MRSA studiat în faza anterioară a proiectului.

- **Concluzii generale**

Obiectivele prevăzute a fi atinse în această etapă a proiectului au fost realizate în întregime în concordanță cu rezultatele estimate la semnarea contractului, deși proiectul a fost afectat de reealonarea cheltuielilor și modificarea duratei de cercetare.

Concluziile trase la finalul proiectului au arătat că există o arie largă de aplicabilitate a medicamentelor expuse la radiație laser UV pentru depășirea cazurilor MDR și că, în același timp, în vederea aplicațiilor clinice trebuie avute în vedere cu strictete o serie de parametri experimentali legați de utilizarea soluțiilor de medicamente.

În același timp, s-a conturat faptul că aria de aplicații poate fi împărțită în două mari categorii:

- Distrugerea culturilor de celule care contaminatează suprafețe, volume, spații.

Pentru continuarea cercetarilor este necesara aplicarea metodei pe culturi de bacterii si estimarea eficientei acesteia prin studii de decontaminare a suprafetelor in medii spitalicesti si/sau in mediul inconjurator deschis.

- Distrugerea pseudotumorilor si tumorilor dezvoltate in sisteme biologice complexe (organisme de animale de laborator si umane).

Pentru dezvoltarea mai departe a cercetarilor este necesara trecerea la nivelul urmator: aplicarea extensiva pe animale de laborator si trecerea la studii preclinice pe pacienti umani.

Atingerea obiectivelor propuse in acestaa etapa a proiectului poate fi evaluata nu numai prin calitatea rezultatelor obtinute ci si prin gradul de diseminare a acestora, care este reflectat in: 3 articole publicate in reviste de specialitate cotate ISI si 3 in pregatire, 5 capitole de carte publicate de edituri internationale si 7 comunicari la conferinte internationale.