

Evaluation of activity of selected chalcogen-containing compounds against bacterial multidrug-resistance

Karolina Witek

Abstract

In view of continuous increase in antibiotic resistance and the pressing need to develop novel antimicrobial agents able to overcome this alarming problem, 75 members of several classes of inorganic and organic chalcogen-containing compounds or nanoparticles were screened for both, their antibacterial activity and the ability to restore the effectiveness of different antibiotics against clinically important ESKAPE pathogens.

In the first stage of the PhD-studies, intrinsic antibacterial effects of chalcogen compounds, expressed as MIC values, were evaluated against Gram-positive and Gram-negative, *i.e.* *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and/or *E. aerogenes*, bacteria by the use of broth microdilution method. In the next step, compounds exerting the most prominent antibacterial activity were investigated for their possible targets and mechanisms of action, *i.e.*: the abilities of compounds to generate intracellular ROS levels as well as to spontaneously react with thiol groups in cysteine-containing proteins. Compounds with a weak antibacterial action were further investigated for their potential “adjuvant” properties, including: (i) general ability to enhance antibiotics efficacy in representative bacterial strains and/or (ii) properties of inhibitors for selected bacterial efflux pumps (Msr(A) in Gram-positives and AcrAB-TolC in Gram-negatives), so called “EPI properties”. For selected adjuvant/EPI compounds, a deeper insight into probable mechanisms of action was investigated, using experimental assays (ethidium bromide and/or fleroxacin accumulation, 1,2'-DNA real-time efflux and nitrocefin-hydrolysis assays) and computer-aided theoretical considerations on non-EP targets (PBP2a). Most of the experiments were performed using methods described earlier, while the EtBr accumulation assays for Msr(A) was first time elaborated within this study. The comprehensive studies performed within this PhD-dissertation allowed to discover potent activities against bacterial MDR for different classes of chalcogen-containing compounds, in respect to suitable modes of action. Regarding antibacterial effects, selenoazolinium salts were found as highly potent, especially 3-bromo-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)[1,2]selenazolo[2,3-a]pyridinium chloride (MICs: 0.31–2.48 µg/mL against 25 ESKAPE clinical isolates). The most promising “adjuvants” and EPIs were found among hydantoin-derived compounds, *i.e.* spirofluorenehydantoins and 5-arylidenimidazolones that were able to restore activities of β-lactam antibiotics against a number of MDR and XDR clinical isolates of MRSA as well as to significantly inhibit the most important MDR efflux pump in *Gram-negative* bacteria, AcrAB-TolC of *E. aerogenes*, in the real-time efflux assays. Especially relevant was an identification of the first, 5,5-dimethylhydantoin-derived, modulator of the efflux pump Msr(A), representing ABC family in *staphylococci* (*S. epidermidis*) since no lines of evidence have indicated agents for this target before. SAR analysis undertaken at the last step of the studies, allowed to indicate the essential structural features as well as to elect lead-structures for further search of new agents, in respect to directed strategies in the battle against bacterial MDR.

Ocena aktywności wybranych połączeń pierwiastków grupy XVI w przeciwdziałaniu lekooporności bakterii

Karolina Witek

Streszczenie

Mając na uwadze ciągły wzrost oporności bakterii na antybiotyki, a także pilną potrzebę poszukiwania nowych środków zdolnych do pokonywania tego problemu, zasadniczym celem mojej pracy doktorskiej był skrining serii 75 organicznych i nieorganicznych połączeń tlenowców, a także ich nanocząstek, w celu oceny ich skuteczności w walce z lekooporną bakterią poprzez działania przeciwbakteryjne lub hamujące różne mechanizmy wielolekooporności (MDR, ang. *multidrug resistance*) izolowanych klinicznie szczepów patogennych bakterii ESKAPE, służące zwiększaniu efektywności antybiotyków.

W pierwszym etapie badań wyznaczono własne działanie przeciwbakteryjne testowanych związków w stosunku do Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* oraz *E. aerogenes*) w testach seryjnych mikrorozcieńczeń w bulionie. W kolejnym kroku, w celu określenia prawdopodobnych mechanizmów działania zidentyfikowanych struktur aktywnych, sprawdzono zdolność związków do generowania wolnych rodników tlenowych (test ROS), jak również do spontanicznej reakcji z grupami tiolowymi białek bakteryjnych. Związki o niskiej aktywności przeciwbakteryjnej badano pod kątem potencjalnych właściwości adjuwanta antybiotyków: (i) w ogólnym teście wpływu na efektywność antybiotyku oraz (ii) w teście na aktywność inhibitora wybranych mechanizmów lekooporności bakteryjnej (pomp Msr (A) dla Gram+ i AcrAB-TolC dla Gram-). Dla wybranych związków o charakterze adjuwanta/inhibitora pompy dokonano głębszej analizy mechanizmów działania w oparciu o badania eksperymentalne (testy akumulacji bromku etyldyny EtBr lub fleroksacyny, kompetycyjnego hamowania wyrzutu 1,2'-DNA oraz hydrolizy nitrocefiny) lub wsparte komputerowo rozważania teoretyczne (wpływ na cel białkowy PBP2a). Większość badań prowadzono z wykorzystaniem opisanych wcześniej testów, a test akumulacji EtBr w szczepie *S. epidermidis* z nadekspresją pompy Msr(A) został opracowany w ramach doktoratu. Wyniki badań otrzymane dla przedstawicieli poszczególnych grup chemicznych umożliwiły przeprowadzenie analizy zależności struktura - aktywność (SAR), która wskazała cechy strukturalne mogące mieć zasadnicze znaczenie dla rozważanych kierunków aktywności. Wszechstronne badania przeprowadzone w ramach doktoratu umożliwiły zidentyfikowanie grup wysoce aktywnych związków, w zależności od oczekiwanego kierunku działania. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wykazały sole selenazolinowe, szczególnie chlorek 3-bromo-2-(1-hydroksy-1-metyloetylo)[1,2]selenazolo[2,3-a]pirydiny (wartości MIC: 0.31–2.48 µg/mL dla 25 patogennych szczepów ESKAPE): Najbardziej obiecującą grupą adjuwantów i inhibitorów pomp lekooporności okazały się pochodne spirofluorenohydantoiny i 5-arylidenoimidazolony, które przywracały aktywność antybiotyków β-laktamowych w wielolekoopornych szczepach *S. aureus* a także wykazały działanie silnego inhibitora AcrAB-TolC w *E. aerogenes*. Szczególnie istotnym osiągnięciem jest odkrycie pierwszego modulatora pompy Msr(A) u bakterii *Staphylococci*, wobec braku doniesień literaturowych na temat innych cząsteczek aktywnych względem tego transportera. Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą wysokich możliwości i różnorodności kierunków działania w walce z lekoopornością bakteryjną dla połączeń chemicznych tlenowców. Zidentyfikowane związki o najwyższej aktywności, w poszczególnych

kategoriach działania, mogą być strukturami wiodącymi do dalszych ukierunkowanych poszukiwań środków przeciwdziałających wielolekooporności bakterii, a nawet być potencjalnymi kandydatami na nowy lek/adjuwant antybiotyku ulepszający terapię zakażeń wywołanych przez wysoce odporne bakterie ESKAPE.

