

# Biološka evaluacija ferocenskih peptida izvedenih iz ferocenske aminokiseline i hidrofobnih aminokiselina - VAL, LEU I PHE

---

Dončević, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:785048>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Ana Mikulić

**BIOLOŠKA EVALUACIJA  
FEROCENSKIH PEPTIDA  
IZVEDENIH IZ FEROCENSKE  
AMINOKISELINE I  
HIDROFOBNIH AMINOKISELINA  
- VAL, LEU I PHE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Mrvčić.



Rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta IP-2020-02-9162, Hrvatske zaklade za znanost.

Naziv projekta: Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija IP

Voditelj projekta: prof. dr. sc. Lidija Barišić

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

### BIOLOŠKA EVALUACIJA FEROCENSKIH PEPTIDA IZVEDENIH IZ FEROCENSKE AMINOKISELINE I HIDROFOBNIH AMINOKISELINA - VAL, LEU I PHE

*Ana Mikulić*, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058211314

#### Sažetak:

Moderna medicina u posljednje se vrijeme susreće s vrlo ozbiljnim problemom prekomjerne i nepravilne uporabe antibiotika što rezultira pojavom bakterijskih sojeva s razvijenim mehanizmima obrane te posljedično pojavom antimikrobne rezistencije. Kako bi se riješio ovaj problem znanstvenici razvijaju nove antimikrobne agense koji bi mogli zamijeniti antibiotike te onemogućiti daljnji razvoj antimikrobne rezistencije. Potencijalni antimikrobni agensi su i ferocenski peptidi čija se biološka evaluacija provodi u ovom radu. Antimikrobna aktivnost ferocenskih peptida **1 - 12** provedena je disk difuzijskom metodom, metodom razrjeđivanja bujona te metodom brojanja kolonija dok su za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištene FRAP i DPPH metode. Antimikrobnu aktivnost prema test mikroorganizmima: *S. aureus*, *B. subtilis*, i *P. aeruginosa* pokazali su samo spojevi Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe (**4**), Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe (**8**) i Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (**12**). Daljnjim istraživanjem ustanovljeno je da spoj **8** primijenjen u koncentraciji 2 mM uzrokuje inhibiciju rasta test mikroorganizama za jedno decimalno razrjeđenje.

**Ključne riječi:** *antimikrobna rezistencija, ferocen, antimikrobna aktivnost, antioksidacijska aktivnost*

**Rad sadrži:** 47 stranica, 12 slika, 17 tablica, 38 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Monika Kovačević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (mentor)
3. prof. dr. sc. Damir Stanzer (član)
4. prof. dr. sc. Lidija Barišić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 22. srpnja 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

BIOLOGICAL EVALUATION OF FERROCENE PEPTIDES DERIVED FROM FERROCENE  
AMINO ACID AND HYDROPHOBIC AMINO ACIDS - VAL, LEU AND PHE

*Ana Mikulić, univ. bacc. ing. techn. aliment.*

0058211314

### Abstract:

Modern medicine is facing a very serious problem namely the excessive and improper use of antibiotics, which leads to the emergence of bacterial strains with developed defense mechanisms and thus to the emergence of antimicrobial resistance. To address this problem, scientists are developing new antimicrobial agents that could replace antibiotics and prevent further development of antimicrobial resistance. Potential antimicrobial agents are ferrocene peptides, and their biological evaluation is examined in this work. The antimicrobial activity of ferrocene peptides **1** - **12** was investigated by the disk diffusion method, the broth dilution method, and the colony counting method, while FRAP and the DPPH method were used to determine the antioxidant activity. Only the compounds Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe (**4**), Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe (**8**) and Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (**12**) showed antimicrobial activity against the test microorganisms: *S. aureus*, *B. subtilis*, and *P. aeruginosa*. Further studies showed that compound **8** at the highest concentration of 2 mM inhibited microbial growth by one decimal dilution.

**Keywords:** *antimicrobial resistance, ferrocene, antimicrobial activity, antioxidant activity*

**Thesis contains:** 47 pages, 12 figures, 17 tables, 38 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Jasna Mrvčić, PhD, Full professor

### Reviewers:

1. Monika, Kovačević, PhD, Assistant professor (president)
2. Jasna, Mrvčić, PhD, Full professor (mentor)
3. Damir, Stanzer, PhD, Full professor (member)
4. Lidija, Barišić, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** July 22<sup>nd</sup>, 2022

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
<b>2. 1. FEROCEN</b> .....	3
<b>2.2. PEPTIDNI MIMETICI</b> .....	4
2.2.1. Ferocenski peptidni mimetici .....	5
<b>2.3. ANTIBIOTICI</b> .....	7
<b>2.4. ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA</b> .....	8
<b>2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST</b> .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
<b>3. 1. MATERIJALI ZA ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI</b> .....	14
3.1.1. Spojevi za biološku evaluaciju .....	14
3.1.2. Test mikroorganizmi .....	15
3.1.3. Hranjive podloge .....	16
3.1.4. Kemikalije .....	18
3.1.5. Uređaji .....	19
3.1.6. Pribor .....	19
<b>3.2. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI</b> .....	21
3.2.1. Priprava otopina dipeptida za određivanje antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti .	21
3.2.2. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti .....	22
3.2.3. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti .....	28
3.2.4. Obrada podataka .....	31
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	32
<b>4.1. ANALIZA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI</b> .....	32
<b>4.2. ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI</b> .....	40
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	43
<b>6. LITERATURA</b> .....	44



# 1. UVOD

Aromatski organometalni spojevi, metaloceni, su spojevi s metalom koje karakterizira prisutnost barem jedne ugljik-metal veze i vrlo visoka stabilnost (Ong i Gasser, 2019). Najznačajniji predstavnik metalocena je ferocen, aromatski „sendvič” spoj koji se odlikuje niskom toksičnošću, visokom stabilnošću, a čiji su derivati izazvali značajan interes znanstvenika kao potencijalni kandidati za antikancerogene, antibakterijske, antifungalne te antiparazitske lijekove (Patra i Gasser, 2017). 1,1'-Disupstituirani feroceni pokazali su se dobrim bioorganometalnim kalupima za pripremu konformacijski ograničenih peptida, peptidomimetika. Peptidomimetici su spojevi čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnog peptida i proteina te zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima pri čemu ostvaruju jednak ili čak unaprijeđen biološki učinak (Barišić, 2018).

U fokusu znanstvenih istraživanja biotehnoške i farmaceutske industrije je pronalazak inovativnih mehanizama antimikrobnog djelovanja te alternative konvencionalnim antibioticima kao odgovor na sveprisutniju antimikrobnu rezistenciju. Istraživanja usmjerena na strukturu antimikrobnih peptida ukazala su na mogućnost dizajna i sinteze membranski aktivnih antibiotičkih peptidnih konjugata (MAAPCs, engl. *membrane-active antibiotic peptide conjugates*), čije se strukturne komponente odlikuju s više različitih oblika antimikrobnog djelovanja, što rezultira sinergističkim inhibicijskim učinkom prema raznim mikrobnim vrstama (Deshayes i sur., 2017). Priprema ferocenskih biokonjugata s antimikrobnim peptidima pokazala se dobrom potencijalnom strategijom u pronalasku selektivnijih i manje toksičnih antimikrobnih lijekova čijim bi se korištenjem smanjila prekomjerna uporaba antibiotika i time izazvana povećana i sveprisutnija antimikrobna rezistencija (Albada i Metzler-Nolte, 2017). Također, osim istraživanja usmjernih na antimikrobna svojstva ferocenskih derivata provode se i ona usmjerena na antioksidacijska svojstva jer se vezanjem ferocena na različite organske molekule povećava njihovo antioksidacijsko djelovanje (Liu, 2011). Antioksidacijska aktivnost predstavlja sposobnost inhibicije i/ili ograničavanja djelovanja molekula s visokim oksido-redukcijskim potencijalom koje narušavaju stabilnost drugih molekula (Brainina i sur., 2019).

Cilj ovog rada bio je provesti evaluaciju (*i*) antimikrobne aktivnosti dvanaest ferocenskih peptida korištenjem bakterijskih i kvašćevih kultura te disk-difuzijske metode,

metode razrjeđivanja hranjivog bujona i metode brojanja kolonija te (ii) antioksidacijske aktivnosti korištenjem FRAP i DPPH metode.

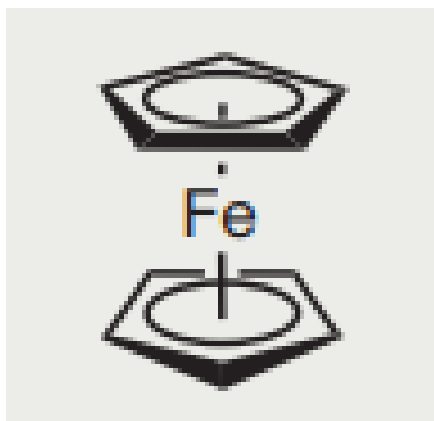
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2. 1. FEROCEN

Organometalni spojevi karakterizirani su prisutnošću barem jedne ugljik-metal veze, pri čemu nukleofilni ugljikov atom iz organometalne molekule može stvarati novu ugljik-ugljik vezu u reakciji s drugim elektrofilnim ugljikovim atomom što omogućuje pripravu kompleksnijih molekula iz manjih prekursora (Ong i Gasser, 2019).

Najpoznatiji organometalni spoje je ferocen, kojeg su Peter L. Pauson i Thomas J. Kealy slučajno sintetizirali 1951. godine (Pauson, 2001). Ferocen, čija je molekulska formula:  $(C_5H_5)_2Fe$ , je aromatski „sendvič” spoj koji se odlikuje visokom stabilnošću i reakcijama elektrofilne supstitucije (Rapić i Čakić Semenčić, 2011). Njegova iznimna stabilnost rezultat je organometalne veze atoma metala, to jest željezovog (II) kationa, i dva aromatska ciklopentadienilna prstena (slika 1). Zbog mogućnosti rotacije oko veze Cp-Fe-Cp, kao i mogućeg gubitka koplanarnosti Cp-prstenova riječ je o vrlo fleksibilnoj molekuli (Rapić i Čakić Semenčić, 2011). Također, velika stabilnost ferocena rezultat je i konfiguracije plemenitog plina koju ima zbog svojih 18 valentnih elektrona (Barišić, 2018).

Ferocen ima nisku potencijalnu toksičnost te je stabilan u neoksidirajućim sredinama, a lipofilni karakter omogućuje je mu lakši prolazak kroz stanične membrane (Ong i Gasser, 2019; Barišić, 2018). Njegovi su derivati izazvali značajan interes znanstvenika kao potencijalni kandidati za antikancerogene, antibakterijske, antifungalne te antiparazitske lijekove (Patra i Gasser, 2017). Lijekovi kao što je ferokin pripravljeni su iz ferocena i klorokina, ovaj lijek posljednjih 30 godina koristi se kao antimalarik (Sijongesonke i Aderibigbe, 2019).



**Slika 1.** Kemijska struktura ferocena (Patra i Gasser, 2017)

Primjena ferocena u bioorganometalnoj kemiji propulzivno raste te je za sada razvijeno nekoliko obećavajućih konjugata s potencijalnim biološkim učinkom (Fouda i sur., 2007). Pimjerice, ferocifen, analog tamoksifena pokazuje dobre rezultate u *in vitro* i *in vivo* studijama kao antikancerogen spoj. Redoks svojstva ferocena upotrebljena su za pripremu različitih vrsta elektrokemijskih senzora (Fouda i sur., 2007).

## 2.2. PEPTIDNI MIMETICI

Zbog visokog afinitet vezivanja, veće specifičnosti i manje toksičnosti peptidi su potencijalno bolje molekule za proizvodnju lijekova u odnosu na druge male molekule te se iz tog razloga intenzivno istražuju (Reese i sur., 2020). Međutim, unatoč brojnim prednostima koje posjeduju, peptidi imaju i nekoliko ograničenja koja ih čine nepogodnima za terapijsku primjenu. Niska metabolička stabilnost prema proteolitičkim enzimima, slaba apsorpcija nakon oralne konzumacije zbog velike molekulske mase, manjak specifičnih membranskih prenosioca i kratko vrijeme zadržavanja u organizmu samo su neke od njih. Također, polarni karakter peptida otežava njihov transport kroz hidrofobne stanične membrane, a moguće su i neželjene nuspojave uzrokovane konformacijskom fleksibilnošću (Sato i sur., 2006).

U cilju iskorištavanja biokompatibilnih i bioaktivnih svojstava peptida te nadilaženja njihovih ograničenja sintetiziraju se peptidomimetici. Peptidomimetik, analog peptida ili peptidni mimetik, je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora to jest peptidomimetik je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnog peptida i proteina te zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak (Barišić, 2018). U usporedbi s nativnim peptidima, peptidomimetici pokazuju veću metaboličku stabilnost, bolju bioraspoloživost, veću selektivnost i minimalne nuspojave (Reese i sur., 2020).

Kod dizajna i sinteze peptidomimetika razlikujemo nekoliko postupaka: ugradnja nepeptidnih kalupa u peptidnu sekvencu, zamjena peptidne veze nepeptidnim analogima, konjugacija aminokiselinskih bočnih ogranaka s malim molekulama te ciklizacija glavnog lanca (Jerić, 2004). Najčešći od njih je umetanje nepeptidnih kalupa u peptidnu strukturu, a glavni zadatak „kalupa“ je ograničiti konformacijsku slobodu te tako spriječiti međudjelovanje s neželjenim receptorima (Jerić, 2004).

### 2.2.1. Ferocenski peptidni mimetici

Konjugiranje organometalnih spojeva s biomolekulama kao što su peptidi koristi se za dobivanje biokonjugata čije značajke potom ovise o svojstvima obiju vrsta molekula. Kod pripreme biokonjugata, ferocen ima brojne prednosti u odnosu na druge kalupe, a jednostavna derivatizacija s biomolekulama, elektrokemijska reverzibilnost i stabilnost samo su neke od njih (Moriuchi i Hirao, 2006).

Istraživanja usmjerena na strukturu antimikrobnih peptida (AMP) ukazala su na mogućnost dizajna i sinteze membranski aktivnih antibiotičkih peptidnih konjugata (MAAPCs) čije se strukturne komponente odlikuju s više različitih oblika antimikrobnog djelovanja, što rezultira sinergističkim inhibicijskim učinkom prema raznim mikrobnim vrstama (Deshayes i sur., 2017). Ferocen utječe na smanjenje stanične razine ATP-a i destabilizaciju membrana povećanjem njihove propusnosti te se stvaranje biokonjugata ferocena s antimikrobnim peptidima pokazalo dobrom potencijalnom strategijom u pronalasku selektivnijih i manje toksičnih antimikrobnih lijekova (Saleem i sur., 2015; Albada i Metzler-Nolte, 2017).

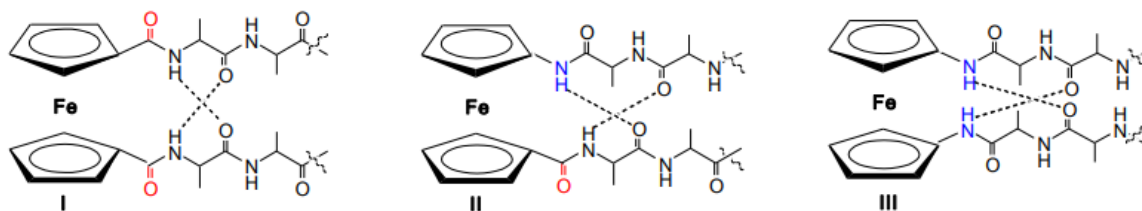
Također, osim istraživanja usmjerenih na antimikrobna svojstva ferocenskih derivata provode se i ona usmjerena na dizajn novih spojeva s antioksidacijskim svojstvima. Smatra se kako bi sintetski derivati ferocena mogli postati nova vrsta antioksidansa jer se vezanjem ferocena na različite organske molekule povećava njihovo antioksidacijsko djelovanje (Liu, 2011).

U svom radu Liu (2011) daje pregled nekonjugiranih i konjugiranih derivata ferocena, pri čemu se kod nekonjugiranih derivata organske molekule ili jednostavni alkilni supstituenti nalaze vezani za ferocen te povećavaju bioraspoloživost ferocena. Kod konjugiranih derivata dolazi do formiranja velikih sustava što olakšava delokalizaciju elektrona u molekuli pri nastajanju radikala i pojačava antioksidacijski kapacitet cijele molekule.

Prilikom dizajna ferocenskih spojeva s potencijalnom antimikrobnom i antioksidacijskom aktivnošću ne smije se zanemariti važnost utjecaja drugih komponenata na biološku aktivnost samog dizajniranog spoja. Kod ferocenskih konjugata s aminokiselinama utvrđeno je da na njihova biološka svojstva utječe i struktura samog aminokiselinskog lanca, to jest svaka od aminokiselina pojedinačno ili u sinergiji sa susjednim aminokiselinama doprinosi antimikrobnim svojstvima peptida (Daniluk i sur., 2019).

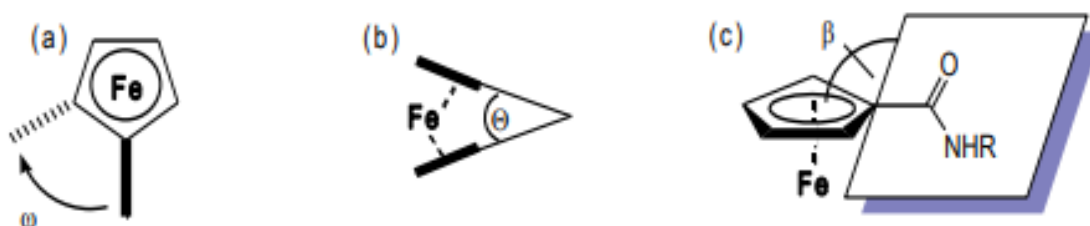
Kod sinteze ferocenskih peptidnih mimetika 1,1'-disupstituirani feroceni pokazali su se kao dobri bioorganometalni kalupi. 1,1'-Disupstituirani feroceni, prikazani na slici 2, dijele se u tri glavne skupine:

$F_n$ -[CO-(AA) $_m$ -OMe] $_2$  (**I**) izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline, Y-(AA) $_n$ -Fca-(AA) $_m$ -OMe (**II**) izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline te  $F_n$ -[NH-(AA) $_m$ -Y] $_2$  (**III**) izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina (Kovačević, 2014).



**Slika 2.** Tri glavne skupine 1,1'-disupstituiranih ferocena (Kovačević, 2014)

Ferocenski peptidi razlikuju se prema konformaciji koja je karakterizirana: torzijskim kutem, kutem iskrivljenosti i izvijenosti (slika 3) na što utječu supstituenti na ciklopentadienilnim prstenovima (Kovačević, 2014). Simetrično supstituirane peptide **I** i **III** odlikuje paralelno usmjerenje peptidnih lanaca, dok su u ferocenskim peptidima **II** peptidni lanci orijentirani antiparalelno. Peptidi **I-III** ostvaruju različite konformacije karakterizirane torzijskim kutom  $\omega$  ( $0 - 180^\circ$ ), kutom iskrivljenosti  $\Theta$  ( $0 - 5^\circ$ ) i kutom izvijenosti  $\beta$  ( $5 - 30^\circ$ ) (De Hatten i sur., 2004).



**Slika 3.** Deformacija fleksibilne ferocenske molekule:

(a) torzijski kut, (b) kut iskrivljenosti i (c) kut izvijenosti (Kovačević, 2014)

## 2.3. ANTIBIOTICI

Moderna medicina nezamisliva je bez antibiotika koji su ju u manje od sto godina u potpunosti promijenili. Antibiotici su lijekovi koji se rabe za liječenje bolesti koje uzrokuju bakterije, a mogu biti (*i*) prirodni spojevi, tj. specifični proizvodi metabolizma nekih bakterija, kvasaca i plijesni, koji koče i zaustavljaju razvoj bakterija (bakteriostatski učinak) ili ih usmrćuju (baktericidni učinak) ili (*ii*) sintetski spojevi (Hutchings i sur., 2019). Prvi antibiotik je Salvarsan, spoj arsena učinkovit protiv *Treponema pallidum* koja uzrokuje sifilis. U primjenu je ušao 1910. godine, a otkrićem penicilina, 1928. započelo je zlatno doba antibiotika izoliranih iz prirodnih izvora koje je vrhunac doseglo sredinom 1950-ih (Hutchings i sur., 2019).

Antimikrobni lijekovi, to jest antibiotici, djeluju tako da inhibiraju sintezu stanične stijenke, proteina i nukleinskih kiselina mikroorganizama te utječu na odvijanje metaboličkih puteva i depolarizaciju stanične membrane (Kapoor i sur., 2017). Razlikuju se antibiotici uskoga spektra djelovanja koji djeluju na pojedine vrste bakterija i antibiotici širokoga spektra djelovanja koji djeluju na više vrste bakterija (Hutchings i sur., 2019). Oni su selektivno toksični za bakterije, a netoksični, odnosno prihvatljivo toksični, za organizam domaćina.

Mehanizmi kojima antibiotici djeluju na bakterije su sljedeći:

- ciljanjem stanične stijenke:  $\beta$ -laktami, glikopeptidi

Bakterijske stanice okružene su staničnom stijenkom napravljenom od peptidoglikana, koji se sastoji od dugih polimera šećera. Peptoglikan podliježe unakrsnom povezivanju lanaca glikana djelovanjem transglikozidaza, a peptidni lanci protežu se od šećera u polimerima i tvore poprečne veze, vezanjem jednog peptida na drugi.  $\beta$ -Laktami i glikopeptidi inhibiraju sintezu stanične stijenke sprječavajući formiranje unakrsnih lanaca (Kapoor i sur., 2017).

- inhibicijom biosinteze proteina: inhibitori 30S podjedinice, inhibitori 50S podjedinice, inhibitori replikacije DNK

Biosintezu proteina kataliziraju ribosomi i citoplazmatski čimbenici. Bakterijski 70S ribosom sastoji se od dvije ribonukleoproteinske podjedinice, 30S i 50S podjedinice. Antibiotici inhibiraju biosintezu proteina ciljajući 30S ili 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma (Kapoor i sur., 2017).

Fluorokinoloni (FQ) inhibiraju enzim bakterijsku DNA girazu, koji razrezuje dvolančanu DNA, uvodi negativne superzavojnice te zatvara izrezane krajeve što je neophodno kako bi se

omogućila replikacija i transkripcija. DNA giraza se sastoji od dvije A podjedinice i dvije B podjedinice. Podjedinica A provodi razrezivanje DNA, podjedinica B uvodi negativne superzavojnice, a zatim podjedinica A ponovno zatvara niti. FQ se veže za podjedinicu A s visokim afinitetom i ometa njenu funkciju rezanja i ponovnog zatvaranja niti (Kapoor i sur., 2017).

- inhibicijom metabolizma folne kiseline (Kapoor i sur., 2017).

Svi antibiotici inhibiraju različite korake u metabolizmu folne kiseline. Sredstva kao što je trimetoprim djeluju u kasnijoj fazi sinteze folne kiseline i inhibiraju enzim dihidrofolat reduktazu (Kapoor i sur., 2017).

Kod liječenja antibioticima bakterije mogu steći otpornost na njihovo djelovanje to jest razviti rezistenciju na njih. Bakterije otpornost stječu mutacijama ili horizontalnim prijenosom gena iz neke druge bakterije, a fekalna flora važan je rezervoar za razvoj i selekciju rezistentnih bakterija (Sundqvist, 2014).

## **2.4. ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA**

Moderna medicina, ali i industrija susreće se s velikim problemom kojeg predstavlja sveprisutnija pojava antimikrobne rezistencije. Antimikrobna rezistencija je sposobnost nekog mikroorganizma da razvije otpornost prema antimikrobnim lijekovima koji su do tada uspješno liječili infekciju koju taj mikroorganizmom izaziva (Blake i sur., 2021). Mehanizmi biokemijske rezistencije koje koriste bakterije kod razvoja antimikrobne rezistencije uključuju sljedeće:

### 1) Sprečavanje nakupljanja antimikrobnih sredstava

Molekule antibiotika u stanicu mogu se prenijeti difuzijom kroz porine, difuzijom kroz dvosloj i samoupijanjem. Smanjenje broja porinskih kanala dovodi do smanjenog ulaska  $\beta$ -laktamskih antibiotika i FQ u stanicu, a time i otpornosti na ove klase antibiotika (Kapoor i sur., 2017).

### 2) Efluks pumpe

Membranski proteini koji izbacuju antibiotike iz stanice i održavaju njihove niske unutarstanične koncentracije nazivaju se efluksne pumpe (Kapoor i sur., 2017).



### 3) Modifikacija ciljne molekule

Prirodne varijacije ili stečene promjene na ciljanim mjestima antimikrobnih sredstava koje sprječavaju njihovo vezanje su uobičajeni mehanizam rezistencije, promjene ciljanog mjesta često su rezultat spontane mutacije bakterijskog gena na kromosomu (Kapoor i sur., 2017).

### 4) Inaktivaciju antibiotika

Postoje tri glavna enzima koji inaktiviraju antibiotike kao što su  $\beta$ -laktamaze, enzimi koji modificiraju aminoglikozide i kloramfenikol acetyltransferaze (Kapoor i sur., 2017).

Do povećanja antimikrobne rezistencije i pristunosti sve većeg broj multirezistentnih patogenih mikroorganizama dovela je kontinuirana, pretjerana i neracionalna uporaba antimikrobnih pripravaka što je posljedično izazvalo porast rezistencije na antibiotike te dovelo do smanjenja djelotvornosti mnogih antibiotika (Woolhouse i Ward, 2013).

Iz ovog se razloga u fokusu znanstvenih istraživanja biotehnoške i farmaceutske industrije nalazi pronalazak alternative antibioticima te inovativnih mehanizama antimikrobnog djelovanja. Veliki broj istraživanja ukazuje na potencijal različitih prirodnih te tako i sintetskih pripravaka u borbi protiv utjecaja proizašlih iz antimikrobne rezistencije. Jedan od primjera je fitokemikalija kurkumin, izolirana iz rizoma *Curcuma longa*, koja pokazuje antimikrobno djelovanje prema različitim vrsta bakterija, među kojima se najviše ističe djelovanja na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Moghadamtousi i sur., 2014).

Albada i Metzler-Nolte (2017) su u svom istraživanju potencijalnih antimikrobnih spojeva koji bi mogli zamjeniti konvencionalne antibiotike proveli biološku evaluaciju organometalnih antimikrobnih peptida čiji su organometalni dio činili ferocen, rutenocen, osmocen ili kobaltocenij. Pretpostavili su da bi se ovaj oblik sintetski pripremljenih spojeva mogao pokazati kao dobar antimikrobni agens s obzirom da bakterije ovakvoj vrsti spojeva prije nisu bile izložene. Organometalni antimikrobni peptidi koje su u svom istraživanju sintetizirali Albada i Metzler-Nolte nisu imali uspjeha kao sistemski antibiotici, ali su se pokazali kao idealni kandidati za topikalne primjene, kao što je liječenje stvaranjem biofilma. Detaljna analiza sintetiziranih spojevi koji su derivati rutenocena otkrila je točan mehanizam njihovog djelovanja na bakterije: integracijom u membranu mijenjaju biofizička svojstva tako da MurG, esencijalni enzim za biosintezu stanične stijenke, i citokroma c, koji je ključna komponenta u bakterijskom respiratornom lancu, istiskuju iz njihovih mjesta u membrani.

Stvaranje stanične stijenke tako je onemogućeno jer je jedna esencijalna komponenta jednostavno odsutna.

U tablici 1. prikazani su rezultati određivanja MIC vrijednosti za neke od sintetiziranih spojeva u istraživanju Albadae i Metzler-Noltea (2017).

**Tablica 1.** MIC (engl. *Minimum Inhibitory Concentration*) vrijednosti sintetiziranih organometalnih antimikrobnih peptida (*prema* Albada i Metzler-Nolte, 2017)

Spoj	MIC ( $\mu\text{M}$ )		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	MRSA
FcC(O)-WRWRW-NH <sub>2</sub>	28 - 57	7,1	28
RcC(O)-WRWRW-NH <sub>2</sub>	47	93	5,8
OcC(O)-WRWRW-NH <sub>2</sub>	44	88 - 175	2,7

Jedno od prvih istraživanja u ovom polju proveli su Chantson i suradnici (2006) koji su proučavali kako uvođenje organometalnih komponenti modificira i pojačava biološku aktivnost peptida. Kao organometalne komponente u ovom istraživanju odabrani su ferocen i kobaltocenij, ferocen je odabran jer se pokazalo da mijenja farmakodinamički profil bioaktivnih spojeva, a izosterični kobaltocenij omogućuje istraživanje utjecaja naboja i redoks potencijala na biološku aktivnost spoja.

U tablici 2. prikazani su rezultati određivanja MIC vrijednosti za neke od sintetiziranih spojeva u istraživanju Chantson i suradnika (2006).

**Tablica 2.** MIC vrijednosti sintetiziranih organometalnih antimikrobnih peptida (*prema* Chantson i sur., 2006)

Spoj	MIC ( $\mu\text{M}$ )		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Cc <sup>+</sup> CO-RWRWR-NH <sub>2</sub>	15	121	> 121
FcCO-WRWRW-NH <sub>2</sub>	57	7,1	28
FcCO-RWRWR-NH <sub>2</sub>	16	16 - 33	16

Osjetljivost mikroorganizama na spojeve s potencijalnim antimikrobnim djelovanjem određuje se disk difuzijskom metodom, dilucijskim postupcima ili molekularno-biološkim metodama, a izbor mikroorganizama koji će sudjelovati u određenoj metodi ovisi o cilju istraživanja (Paul i sur., 2006).

Uz pronalazak alternative antibioticima te inovativnih mehanizama antimikrobnog djelovanja kao mogućnost smanjenja utjecaja sveprisutnije antimikrobne rezistencije, navodi se potencijal reverzibilnosti rezistencije na antibiotike kroz smanjenje upotrebe antibiotika koji ovisi o sposobnosti mehanizama rezistencije (obično se mjeri kao smanjena stopa rasta), epidemijskom potencijalu bakterije to jest soja i putu prijenosa vrste (Sundqvist, 2014).

## **2.5. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST**

Antioksidacijska aktivnost predstavlja sposobnost inhibicije i/ili ograničavanja djelovanja molekula s visokim oksido-redukcijskim potencijalom koje uslijed svoje reaktivnosti i težnje za postizanjem stabilne elektronske konfiguracije narušavaju stabilnost drugih molekula (Brainina i sur., 2019). Tvari koje sprječavanjem inicijalnog stvaranja slobodnih radikala, hvatanjem slobodnih radikala ili usporavanjem brzine lančanih oksidacijskih reakcija, onemogućavaju neželjene procese oksidacije različitih supstrata (proteina, lipida, enzima, nukleinskih kiselina i dr.), nazivaju se antioksidansima (Harris i DeNicola, 2020).

Antioksidansi se svrstavaju u nekoliko skupina i to:

- prema načinu djelovanja - enzimski i neenzimski,
- fizikalno-kemijskim svojstvima - lipofilni i hidrofilni
- prisutnosti u organizmu - endogeni ili egzogeni
- izvoru - prirodni i sintetski (Gupta, 2015).

Slobodni radikali su molekule endogenog ili egzogenog podrijetla u čijoj se vanjskoj elektronskoj ljusci nalazi jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnima i reaktivnima, mogu se ponašati kao akceptor ili donori elektrona te tako pokrenuti lančane reakcije nastajanja slobodnih radikala (Lobo i sur., 2010).

Razlikuju se:

- reaktivni oblici kisika (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) kao što su: superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) ili hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ),
- reaktivni oblici dušika (RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*) kao što su: dušikov monoksid ( $NO^{\cdot}$ ) i dušikov dioksid ( $NO_2^{\cdot}$ ) (Di Meo i sur., 2016).

Oksidacijski stres je pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji, kao posljedica iscrpljivanja antioksidansa ili nakupljanja ROS-a uslijed uspostavljanja patoloških uvjeta (Birben i sur., 2012). On doprinosi nastajanku različitih patoloških stanja i bolesti poput raka, neuroloških poremećaja, ateroskleroze, hipertenzije te mnogih drugih (Rajendran i sur., 2014).

Antioksidansi na slobodne radikale mogu djelovati preko HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) i SET (engl. *Single Electron Transfer*) mehanizma, to jest da kao donori vodika ili prijenosom jednog elektrona reduciraju metalne ione, karbonile i radikale (Prior i sur., 2005). Iz tog se razloga metode koje se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti temelje na SET ili HAT mehanizmu, a to su najčešće spektrofotometrijske metode kojima se prati promjena koncentracije reaktanata ili produkata u reakciji potencijalnog antioksidanasa sa slobodnim radikalima (Prior i sur., 2005).

Metode temeljene na SET mehanizmu:

- TEAC (engl. *The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*),
- DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate*),
- FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*)
- FCR (engl. *Folin-Ciocalteu Reagent*) (Prior i sur., 2005).

Metode temeljene na HAT mehanizmu:

- TRAP (engl. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*),
- ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
- DPPH i TEAC mogu se temeljiti na HAT mehanizam (Prior i sur., 2005).

Različite vrste molekula posjeduju antioksidativna svojstva, od kojih antioksidativni peptidi imaju velik značaj zbog doprinosa ljudskom zdravlju kroz prevenciju i liječenje nezaraznih kroničnih degenerativnih bolesti, kao što su kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, rak, reumatoidni artritis ili dijabetes (Zou i sur., 2016). Karakteristična kemijska strukture peptida

jedan je od glavnih čimbenika koji utječu na njihovo antioksidativno djelovanje, strukture proteina prekursora peptida i njihov hidrolitički proces također mogu utjecati na antioksidativno djelovanje (Zou i sur., 2016). Također, antioksidativno djelovanje i izraženost istog usko je povezana sa redosljedom aminokiselina i aminokiselinskim sastavom peptida. Aminokiseline, kao što su glicin, prolin i leucin čine 33,7 % ukupnih aminokiselina u antioksidativnim peptidima, alanin, tirozin i valin čine 18,7 %, a cistein, metionin i glutamin su najmanje zastupljene aminokiseline u antioksidativnim peptidima (Zou i sur., 2016).

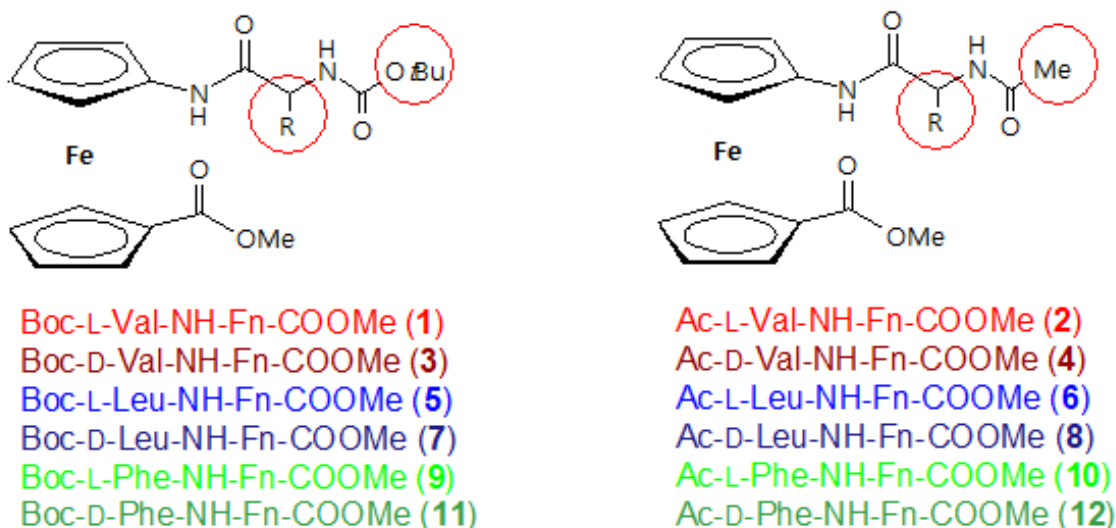
### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3. 1. MATERIJALI ZA ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

##### 3.1.1. Spojevi za biološku evaluaciju

U ovom radu provedena je biološka evaluacija dvanaest ferocenskih dipeptida sintetiziranih u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za pripremu ciljnih ferocenskih dipeptida (**1 - 12**) korištena je ferocenska aminokiselina (FcA) i D- ili L- hidrofobne aminokiseline (Val, Leu i Phe). Poznato je da se biokonjugati koji su pripremljeni iz različitih ferocenskih osnova i aminokiseline ponašaju kao peptidomimetici jer mogu tvoriti razne elemente sekundarne strukture peptida (okrete, plohe, uzvojnice), a za koje je zaslužna tvorba intramolekulskih vodikovih veza. Da bi se ispitalo kako kiralnost hidrofobnih aminokiseline i zaštitna skupina (zaokruženo na slici 4) utječe na konformacijske preferencije pripremljenih peptidomimetika, a samim time i na biološku aktivnost, pripremljeno je dvanaest ferocenskih dipeptida tipa: Ac(Boc)-L(D)-AA-NH-Fn-COOMe (**1 - 12**) [Fn=ferrocenilen, AA= valin, leucin ili fenilalanin, Boc=*tert*-butoksikarbonil, Ac=acetil (slika 4)].

Spojevi su iz grupe ferocenskih dipeptida navedeni su u tablici 3.



**Slika 4.** Dvanaest sintetiziranih ferocenskih dipeptida

**Tablica 3.** Molekulska masa ferocenskih dipeptida 1 - 12 čija se antimikrobna i antioksidacijska aktivnost određuje

<b>Spoj</b>	<b>Molekulska masa (g/mol)</b>	<b>Spoj</b>	<b>Molekulska masa (g/mol)</b>
Boc-L-Val-NH-Fn-COOME (1)	456,3	Ac-L-Val-NH-Fn-COOME (2)	398,2
Boc-D-Val-NH-Fn-COOME (3)	456,3	Ac-D-Val-NH-Fn-COOME (4)	398,2
Boc-L-Leu-NH-Fn-COOME (5)	470,3	Ac-L-Leu-NH-Fn-COOME (6)	412,2
Boc-D-Leu-NH-Fn-COOME (7)	470,3	Ac-D-Leu-NH-Fn-COOME (8)	412,2
Boc-L-Phe-NH-Fn-COOME (9)	504,4	Ac-L-Phe-NH-Fn-COOME (10)	446,4
Boc-D-Phe-NH-Fn-COOME (11)	504,4	Ac-D-Phe-NH-Fn-COOME (12)	446,4

### 3.1.2. Test mikroorganizmi

U svrhu određivanja antimikrobne aktivnosti sintetiziranih dipeptida kao test mikroorganizmi odabrane su mikrobne vrste navedene u tablici 4.

**Tablica 4.** Mikrobne vrste korištene kao test mikroorganizmi za određivanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih spojeva

<b>Gram pozitivne bakterije</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Gram negativne bakterije</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium
<b>Bakterije mliječne kiseline (BMK)</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<b>Kvasci</b>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Candida utilis</i>
	<i>Rhodotorula sp.</i>

Korištene bakterijske i kvaščeve kulture pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca Zavoda za prehrambeno tehnološko inženjerstvo Prehrambeno–biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a kao trajne kulture čuvaju se u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica istog fakulteta. Navedene bakterijske vrste imaju optimalnu temperaturu rasta pri temperaturi 37 °C i 32 °C (BMK), dok je optimalna temperatura rasta kvasaca 28 °C.

### 3.1.3. Hranjive podloge

Pri određivanju antimikrobne aktivnosti u ovom radu korištene su sljedeće hranjive podloge: hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija te hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca.

#### 1) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija:

1. Mueller-Hinton agar, MHA (Biolife, Milano, Italija) čiji je sastav defitniran tablicom 5:



**Tablica 5.** Sastav Mueller-Hinton agara

Sastojci	g/L destilirane vode
Mesni ekstrakt	2,0
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0

Priprema hranjive podloge: 38 g MHA otopi se u 1 L destilirane vode, otopina se zagrije do potpunog otapanja te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, MHA se ohladi na oko 55 °C razlije u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice čuvaju se do korištenja u hladnjaku pri +4 °C.

2. MRS (Man – Rogosa – Sharpe), (Biolife, Milano, Italija) podloga čiji je sastav definiran tablicom 6:

**Tablica 6.** Sastav MRS podloge

Sastojci	g/L destilirane vode
Glukoza	20
Mesni ekstrakt	10
Kazein hidrolat	10
Kvašćev ekstrakt	10
Kalijev hidrogenfosfat	5
Amonijev citrat	2
Natrijev acetat	2
MnSO <sub>4</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	0,05
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,1
Tween 80	1
Agar	20

Priprema hranjive podloge: sastojci se pomiješaju u navedenim količinama u 1 L destilirane vode, otopina se zagrije do potpunog otapanja te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, MRS podloga se ohladi na oko 55 °C i razlije u sterilne Petrijeve

zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice čuvaju se do korištenja u hladnjaku pri +4 °C.

## 2) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca:

1. Mueller-Hinton agar, MHA (Biolife, Milano, Italija) uz dodatak glukoze čiji je sastav defitniran tablicom 7:

**Tablica 7.** Sastav Mueller-Hinton agara za kvasce

Sastojci	g/L destilirane vode
Mesni ekstrakt	2,0
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0
Glukoza	20,0

Priprema hranjive podloge: 38 g MHA otopi se u 1 L destilirane vode, otopina se zagrije do potpunog otapanja te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, MHA se ohladi na oko 55 °C i razlije u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice čuvaju se do korištenja u hladnjaku pri +4 °C.

Osim krutih podloga, za uzgoj pojedinih mikrobnih vrsta u tekućim podlogama korištene su podloge istog sastava bez dodatka agara kao što je: Mueller-Hinton bujon (MHB) istog sastava kao MHA samo bez dodatka agara.

### 3.1.4. Kemikalije

Sve kemikalije korištene pri radu bile su visoke analitičke (p.a.) čistoće.

#### 1) Kemikalije korištene za određivanje antimikrobne aktivnosti:

- Kanamicin otopina (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka, 50 mg/L)
- antimikrobni disk papirići s kanamicinom 50 µg (Biolab Inc, Budimpešta, Mađarska)
- antimikrobni disk papirići s nistatinom 100 µg (Biolab Inc, Budimpešta, Mađarska)
- DMSO, dimetil sulfoksid, (Lach-Ner, s.r.o., Továrni, Češka)
- sterilna voda
- destilirana voda

## 2) Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti:

- destilirana voda
- octena kiselina (J.T. Baker, Njemačka)
- natrijev acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- TPTZ, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , željezo (III)-klorid-heksahidrat, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 37%-tna HCl, klorovodična kiselina, (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Francuska)
- DMSO, dimetil sulfoksid, (Lach-Ner, s.r.o., Továrni, Češka)
- sterilna voda
- 96%-tni etanol
- Trolox, 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 carboxylic acid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrozyl, (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)

### 3.1.5. Uređaji

- autoklav (Sutjeska, Beograd, Srbija)
- termostat (Termo medicinski aparati Bodalec, Republika Hrvatska)
- vibromješač, MS 3 digital (IKA, SAD)
- analitička vaga, Mettler (E. Mettler Zürich, Švicarska)
- spektrofotometar, Specord 50 plus (Analytik Jena, Njemačka)
- mikrobiološki zaštitni kabinet (Klimaoprema, Zagreb, Republika Hrvatska)
- hladnjak sa zamrzivačem (Končar, Republika Hrvatska)
- čitač mikrotitarskih ploča, Tecan (Tecan, Grodig, Austrija)

### 3.1.6. Pribor

- automatske pipete s nastavcima (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- trbušaste pipete
- graduirane pipete
- plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- mikrobiološka ušica
- Erlenmeyerove tikvice

- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikroepuvete (2 mL)
- Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm)
- laboratorijske čaše
- laboratorijski stalci
- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- odmjerne tikvice
- mikrotitarska ploča s 96 jažice, Falcon® ( Becton Dickinson & Company, New Jersey, SAD)

## 3.2. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

### 3.2.1. Priprava otopina dipeptida za određivanje antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti

Za potrebe određivanja antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti sintetiziranih dipeptida pripremljene su otopine svakog pojedinog spoja u nekoliko različitih koncentracija. Zbog njihove slabe topljivosti u vodi kao otapalo korišten je DMSO (dimetil sulfoksid). Za određivanja antimikrobnih svojstava pripremljene su otopine spojeva sljedećih koncentracija:

- $c = 100 \text{ mg/mL}$  (za disk difuzijsku metodu; aplicirano  $10 \text{ }\mu\text{L}$  po disku tj.  $1 \text{ mg/disku}$ .  $1 \text{ mg}$  spoja otopi se u  $10 \text{ }\mu\text{L}$  DMSO i cijeli volumen se aplicira na disk; molaritet otopina za pojedini spoj prikazan je u tablici 8;  $198\text{-}251 \text{ mM}$ )
- $c = 2 \text{ mM}$  (početna koncentracija za metodu razrjeđivanja hranjivog bujona za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije;  $1 \text{ mg}$  spoja otopi se u  $20 \text{ }\mu\text{L}$  DMSO te se doda odgovarajuća hranjiva podloga do ukupnog volumena prikazanog u tablici 8)

Antioksidacijska aktivnost određena je pri koncentraciji  $c = 1 \text{ mM}$  (za FRAP i DPPH metodu;  $1 \text{ mg}$  spoja otopi se u  $10 \text{ }\mu\text{L}$  DMSO)  $5 \text{ }\mu\text{L}$  otopine razrijedi se s DMSO do ukupnog volumena prikazanog u tablici 8.

**Tablica 8.** Molariteti otopina sintetiziranih spojeva za potrebe određivanje njihove antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti

Spoj	Molarna masa (g/mol)	Volumen ukupni (μL)	Molaritet otopina za određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom (mM)	Molaritet otopina za određivanje antioksidativne aktivnosti (mM)
<b>1*</b>	456,3	1095	219	1
<b>2</b>	398,2	1255	251	1
<b>3</b>	456,3	1095	219	1
<b>4</b>	398,2	1255	251	1
<b>5</b>	470,3	1060	212	1
<b>6</b>	412,2	1215	243	1
<b>7</b>	470,3	1060	212	1
<b>8</b>	412,2	1215	243	1
<b>9</b>	504,4	990	198	1
<b>10</b>	446,4	1120	224	1
<b>11</b>	504,4	990	198	1
<b>12</b>	446,4	1120	224	1

\*primjer antimikrobna:  $\frac{0,1g/mL}{456,3g/mol} * 1000 = 219 \text{ mM}$  (1 mg spoja u 10 μL je konc 219 mM)

\* primjer antioksidativna:  $c1 * V1 = c2 * V2$  (219 mM \* 5 μL)/1mM = 1095μL (5μL spoja+ 1090 μL DMSO)

### 3.2.2. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost sintetiziranih dipeptida određena je disk difuzijskom metodom, metodom razrjeđivanja hranjivog bujona uz određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) te metodom brojanja kolonija. Disk difuzijska metoda provedena je na svih dvanaest sintetiziranih spojeva, dok je metoda razrjeđivanja hranjivog bujona provedena samo na dipeptidima **4**, **8** i **12** jer su oni jedini pokazali antimikrobnu aktivnost tijekom provođenja disk

difuzijske metode. Metoda brojanja kolonija provedena je samo sa spojem 8 koji je u prijašnjim metodama pokazao najbolje rezultate. Ove metode su pouzdane te se i uobičajeno koriste kod određivanja antimikrobne aktivnosti spojeva.

Neovisno o izboru metode potrebno je uzeti u obzir čimbenike koji imaju izravan utjecaj na rezultate istraživanja poput izbora test mikroorganizma, svojstava testiranih uzoraka te odgovarajućeg medija. Mikroorganizmi korišteni pri određivanju antimikrobne aktivnosti navedeni su u tablici 4, dok su za određivanje MIC vrijednosti metodom razrijeđivanja hranjivog bujon i brojanja kolonija korišteni samo: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* jer su samo prema njima spojevi **4**, **8** i **12** pokazali antimikrobnu aktivnost.

Otopine, pribor i posuđe korišteno pri određivanju antimikrobnih svojstava prethodno je sterilizirano te su svi postupci određivanja provedeni u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu.

#### *Čuvanje mikroorganizama*

Test mikroorganizmi čuvaju se na odgovarajućem kosom agaru pri +4 °C. Sve vrste test mikroorganizama trajno su pohranjene pri – 70 °C uz dodatak 50 % (v/v) glicerola.

#### *Priprava prekonoćnih kultura mikroorganizama*

Pri izradi ovog rada koriste se revitalizirane i identificirane čiste kulture bakterija i kvasaca koje se aseptičnim postupkom s hranjivog agara precijepu u 5 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Tako pripremljene kulture inkubiraju se u termostatu tijekom 24 h pri 37 °C za bakterije, odnosno 28 °C za kvasce i 32 °C za BMK.

#### *Priprema inokuluma*

U epruvete u koje je prethodno dodano 5 mL sterilne vode prenese se 500 µL pripremljenih prekonoćnih kultura test mikroorganizama. Sadržaj u epruvetama zatim se homogenizira i odredi mu se vrijednost optičke gustoće pri valnoj duljini od 550 nm. Ciljana vrijednost apsorbancije bakterijskih i kvašćevih suspenzija pri 550 nm jest 0,125 što, prema McFarland standardu prikazanom u tablici 9, odgovara koncentraciji oko  $1,5 \times 10^8$  st/mL.

Početna koncentracija inokuluma koja se koristi u daljnjim postupcima određivanja antimikrobne aktivnosti iznosi približno  $1 \times 10^6$  st/mL, a postiže se nacjepljivanjem 100  $\mu$ L prethodno standardiziranih suspenzija test mikroorganizama u 9,9 mL odgovarajućeg hranjivog bujona.

**Tablica 9.** McFarlandova ljestvica i njezini standardi (McFarland, 1907)

Standard	Koncentracija mikrobnih stanica* ( $\times 10^8$ st/mL)	Teoretska optička gustoća ** pri 550 nm
0,5	1,5	0,125
1	3	0,25
2	6	0,5
3	9	0,75
4	12	1,00
5	15	1,25

\*Koncentracija mikroorganizama ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost

\*\*Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći suspenzije mikroorganizama

### *Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom*

#### Princip metode:

Disk difuzijska metoda određivanja antimikrobne aktivnosti službena je metoda određivanja antimikrobne osjetljivosti u mnogim kliničkim mikrobiološkim laboratorijima (Balouiri i sur., 2016). Ova metoda temelji se na određivanju promjera zone inhibicije koji se pojavljuje oko diska natopljenog ispitivanim spojem, postavljenim na čvrstu hranjivu podlogu prethodno inokuliranu test mikroorganizmom. Medij u kojem rastu patogeni, temperatura, vrijeme inkubacije i koncentracija mikroorganizama određeni su prema CLSI (engl. *The Clinical & Laboratory Standards Institute*) standardima. Prednosti ove metode su jednostavnost pri izvođenju, mogućost istovremenog ispitivanja većeg broja uzoraka, ekonomska isplativost i relativno jednostavno očitavanje rezultata. Rezultati ove metode su kvalitivni i omogućavaju razvrstavanje test mikroorganizama na osjetljive, umjereno osjetljive ili rezistentne u odnosu na korišteno antimikrobno sredstvo (Balouiri i sur., 2016). Međutim, ovom metodom ne mogu se odrediti bakteriostatski ili baktericidni učinka kao ni minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).



### Postupak određivanja:

100  $\mu\text{L}$  pripremljene homogenizirane suspenzije čiste mikrobne kulture test mikroorganizma naciepljuje se na prethodno nanešeni sloj Mueller-Hintonovog agara (debljine 4 mm) u Petrijevoj zdjelici. Zatim se na agar postavljaju 4 dijagnostička filter diska (promjera 6 mm) natopljena s 10  $\mu\text{L}$  jednog od pripremljenih uzoraka čiji je molaritet definiran u tablici 8. Kod provedbe metode koriste se DMSO kao negativna kontrola, kanamicin kao pozitivna kontrola za bakterije te nistatin kao pozitivna kontrola za kvasce. Nakon postavljanja diskova, Petrijeva zdjelica se stavlja u hladnjak na 20 minuta kako bi antimikrobne tvari počele difundirati u hranjivu podlogu potom se inkubira u termostatu pri 37 °C, odnosno 28 °C ili 32 °C, ovisno o vrsti test mikroorganizma. Nakon završetka inkubacije, rezultati se očitavaju mjerenjem inhibicijske zone izražene u mm oko svakog diska. Za svaki spoj i test mikroorganizam provedene su analize u paralelama.

### *Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom razrjeđivanja bujona*

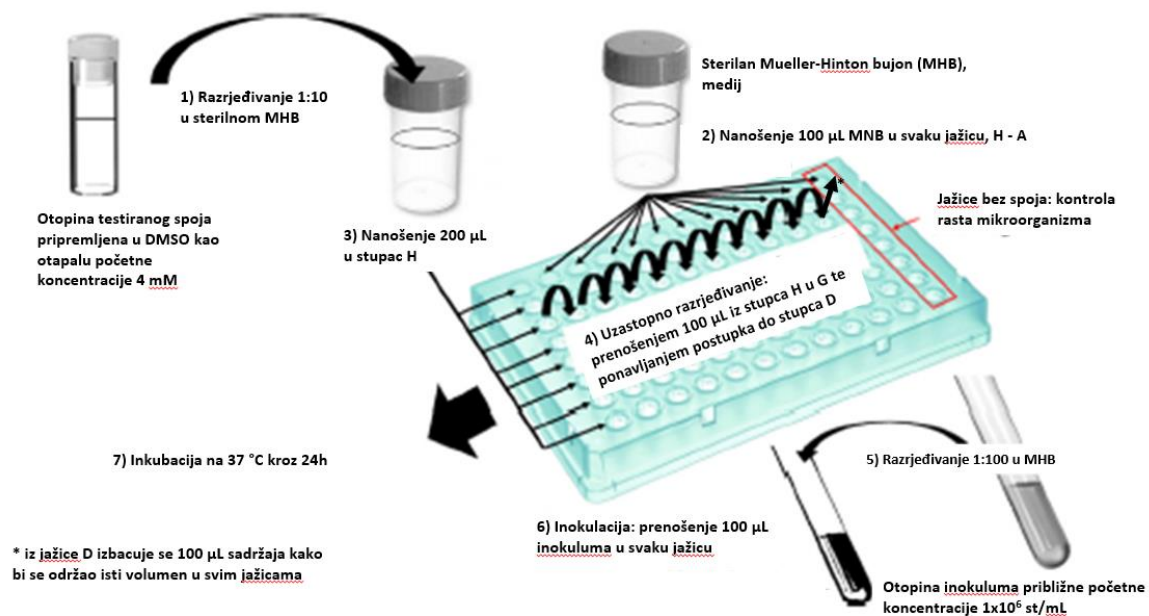
#### Princip metode:

Dilucijski postupci najprikladniji su za određivanje vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, engl. *Minimum Inhibitory Concentration*) ispitivanog uzorka u agaru ili bujonu te se mogu koristiti za kvantitativno određivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka prema bakterijama i kvascima *in vitro* (Balouiri i sur., 2016). Minimalna inhibitorna koncentracija je najmanja koncentracija ispitivanog uzorka koja inhibira rast test mikroorganizma, a njena vrijednost omogućuje razvrstavanje mikroorganizama na kojima je testiranje provedeno na osjetljive, srednje osjetljive i otporne prema testiranom antimikrobnom sredstvu (Balouiri i sur., 2016). Metoda razrjeđivanja hranjivog bujona može se izvoditi na dva načina, u mikropruветama minimalnog volumena 2 mL ili pomoću mikrotitarskih pločica s jažicama te shodno tome postoje makrodilucijski i mikrodilucijski postupak. U ovom radu antimikrobna aktivnost ferocenskih dipeptida **4**, **8** i **12** istražena je primjenom mikrodilucijske metode i izražena kao MIC vrijednost.

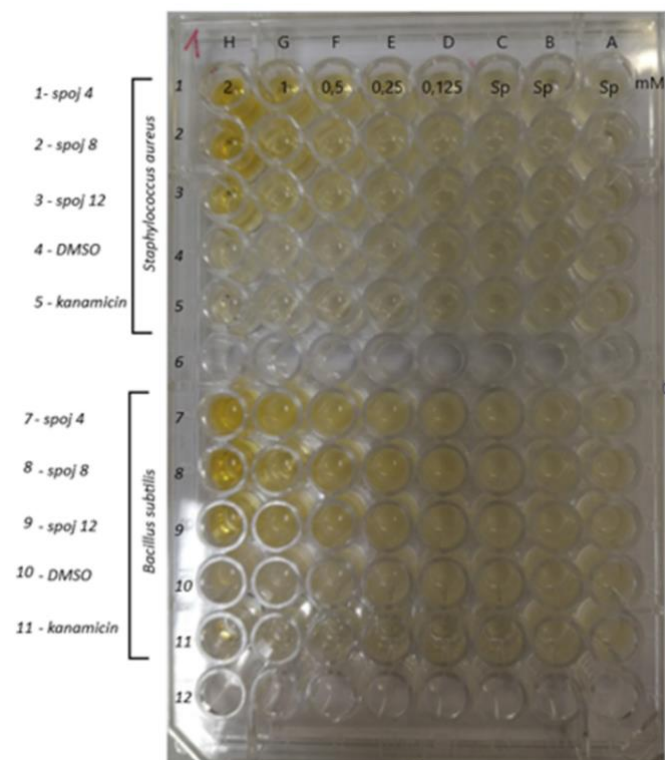
#### Postupak određivanja:

Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom razrjeđivanja hranjivog bujona provedeno je pomoću dvije pločice za mikrodiluciju okrenute vertikalno tako da su redovi označeni brojevima 1 - 12, a stupci slovima H - A. Na ovaj način istovremeno je ispitana

antimikrobna aktivnosti dipeptida **4**, **8**, i **12** prema trima različitim test mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa*). Svaki mikroorganizam tretiran je u jednom redu s otapalom DMSO da bi se eliminirao njegov učinak na antimikrobnu aktivnost te u jednom redu s antibiotikom kanamicinom. Također, svaki spoj je u jednom redu nacjepljen samo u neinokulirani hranjivi bujom kako bi se mogla odrediti apsorbancija samog spoja koja je kod obrade rezultata oduzeta od rezultata očitanih u redovima u kojima se određivala antimikrobna aktivnost. Sam postupak proveden je tako da je u stupac G stavljeno 200  $\mu\text{L}$  spoja (dipeptid 4, 8 ili 12) koncentracije 2 mM, a u stupce F - A 100  $\mu\text{L}$  hranjivog bujona. Zatim je uzastopnim prenošenjem, u jednom po jednom redu, iz stupca G do stupca D prenošeno po 100  $\mu\text{L}$  sadržaja prethodne jažice čime se dobiva gradijent koncentracije potreban za određivanje MIC-a. 100  $\mu\text{L}$  iz jažica u stupcu D izbačeno je kako bi ukupni volumen svih jažica ostao isti. Potom je u sve jažice dodatno 100  $\mu\text{L}$  hranjivog bujona inokuliranog jednim od test mikroorganizama, nakon ovog koraka početna koncentracija spoja u stupcu G je 1 mM. U redovima u kojima je analizirani spoj zamijenjen kanamicinom uzastopno prenošenje sadržaja provođeno je do stupca B kako bi se dobio veći gradijent koncentracije, dok je u redovima s DMSO ono provođeno do stupca D kao i u redovima sa spojevima. Na slici 5 je shematski prikaz koraka u provođenju metode, a na slici 6 se nalazi pločica nakon što su u sve jažice stavljenje otopine po protokolu navedenom u ovom paragrafu. Pločice su potom stavljene na termostatanje tijekom 24 sata na temperaturi 37 °C.



Slika 5. Shema provođenja metode razrjeđivanja hranjivog bujona (prema Balouiri i sur., 2016)



Slika 6. Primjer izgleda mikrotitarske pločice kod određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija pojedinih analiziranih spojeva na testirane mikrobne vrste (vlastita fotografija)

### *Određivanje antimikrobne aktivnosti brojanjem kolonija mikroorganizma*

#### Princip metode:

Za ovaj postupak koristi se čvrsta hranjiva podloga na koju se nanosi prethodno pripremljeno decimalno razrjeđenje testiranog mikroorganizma tijekom rasta u podlozi sa i bez testiranog spoja čija se antimikrobna aktivnost ispituje.

#### Postupak određivanja:

Testiran je spoj **8** koji je po prethodnim eksperimentima pokazao najveći potencijal za daljnja istraživanja, a ispitivani mikroorganizmi su: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Pripremljene su otopine mikroorganizama s koncentracijama spoja 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM te slijepa proba, otopina mikroorganizma bez testiranog spoja. Ove otopine su nacjepljivanje na hranjivu podlogu u nultom satu potom nakon 90 minuta, 3 sata, 8 sati te nakon 24 sata. Prilikom svakog nacjepljivanja nacjepljuje se i slijepa proba. Na čvrstoj hranjivoj podlozi nacjepljuju se dva do tri decimalna razrjeđenja te za svako decimalno razrjeđenje po četiri paralele u kapljicama po 10 µL. Nakon provedene inkubacije, 24 h na 37 °C, izbroje se porasle kolonije na hranjivoj podlozi te se izračuna broj živih stanica po mililitru uzorka koji se izražava kao CFU (eng. colony forming units) jedinice pri čemu je  $CFU = \text{broj kolonija} / \text{volumen uzorka} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}$ .

### 3.2.3. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

#### *Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom*

#### Princip metode:

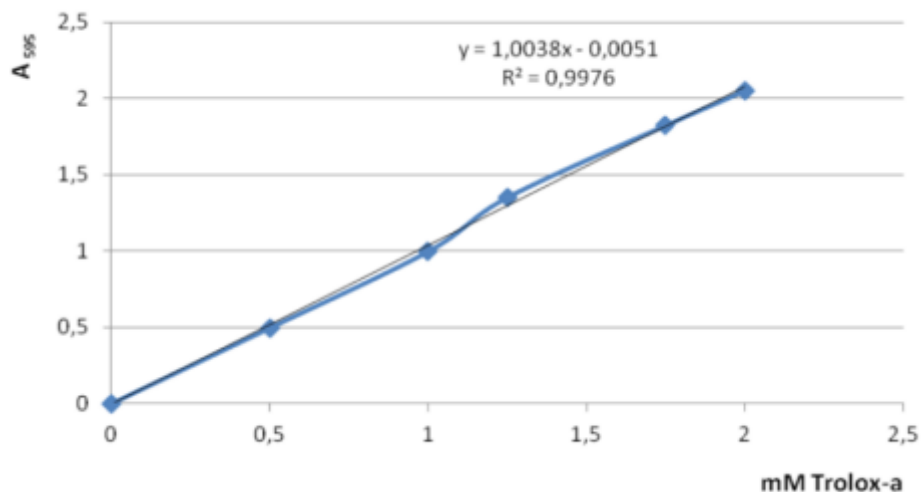
FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) jednostavna, brza i robusna kolorimetrijska metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Moon i Shibamoto, 2009). Temelji se na principu redukcije žuto obojenog kompleksa  $Fe^{3+}$ -TPTZ u  $Fe^{2+}$ -TPTZ oblik dodatkom antioksidansa pri niskom pH. Kao posljedica redukcije nastaje plavo obojani kompleks čiji je apsorpcijski maksimum pri 593 nm. Intezitet i brzina formiranja plavo obojenog  $Fe^{2+}$ -TPTZ kompleksa ovise o redukcijskoj snazi i koncentraciji dodanog antioksidansa.

### Reagensi:

- 0,3 mM acetatni puffer - priprema: 0,93 g bezvodnog (0,186 g/100 mL) natrijevog acetata otopi se u 8 mL octene kiseline u tikvici od 500 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake;
- 40 mM otopina klorovodične kiseline - priprema: 400 mL 0,1 M klorovodične kiseline u odmjernoj tikvici od 1 L razrijedi se destiliranom vodom do oznake;
- 10 mM otopina TPTZ - priprema: 0,0312 g TPTZ se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL koja se potom nadopuni do oznake s 40 mM otopine klorovodične kiseline;
- 20 mM otopina FeCl<sub>3</sub> - priprema: 0,0541 g željezova (III) klorida kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake;
- FRAP reagens - priprema: svježi FRAP reagens dobije se miješanjem 25 mL 0,3 M acetatnog pufera, 2,5 mL 10 mM otopine TPTZ reagensa i 2,5 mL 20 mM otopine željezova (III) klorida

### Postupak određivanja:

Nakon pripreme reagenasa, u epruvete se otpipetira 2080  $\mu$ L svježe pripremljenog FRAP reagensa, 80  $\mu$ L uzorka (pripremljenih otopina dipeptida **1 - 12**,  $c = 1$  mM koju smo pripremili pomoći tablice 8) i 240  $\mu$ L destilirane vode. Slijepa proba priprema se na prethodno opisani način pri čemu se umjesto uzorka dodaje 80  $\mu$ L DMSO-a. Sadržaj u epruvetama se homogenizira i termostatira pet minuta pri 37 °C. Po završetku termostatiranja, uzorci se spektrofotometrijski analiziraju mjerenjem apsorbancije pri 595 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancija uvrstavaju se u jednadžbu baždarnog pravca koja je prikazana na slici 7 te se rezultati izražavaju kao mM Trolox ekvivalenta (TE). Mjerenje se provodilo u dva ponavljanja te je prilikom prikazivanja rezultata korištena aritmetička sredina dobivenih vrijednosti mjerenja.



**Slika 7.** Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti sintetiziranih spojeva FRAP metodom (Ivančić i Kovač, 2021)

#### *Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom*

##### Princip metode:

DPPH metoda pripada skupini kolorimetrijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata i/ili čistih spojeva. DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikal) stabilan je i komercijalno dostupan organski dušikov radikal, a svoju stabilnost duguje svojstvu delokalizacije slobodnog elektrona. DPPH• reagira s različitim spojevima što ovu metodu čini prikladnom za određivanje antioksidacijske aktivnosti u složenim biološkim sustavima, ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa, a može se izvoditi u organskim i vodenim otapalima. Otopina DPPH• je tamnoljubičaste boje s apsorpcijskim maksimumom pri 517 nm. U reakciji s antioksidansom, DPPH• prelazi u reducirani oblik što se očituje pojavom stehiometrijskog obezbojenja koje ovisi o broju primljenih elektrona. Smanjenje apsorbancije uslijed pojave obezbojenja u reakciji DPPH radikala s antioksidansom temelj je DPPH metode. Značajnije smanjenje apsorbancije reakcijske smjese ukazuje na bolju sposobnost vezanja testiranog spoja na slobodni radikal.

##### Reagensi:

- 0,1 mM DPPH reagens - priprema: potrebno je otopiti 0,0394 g DPPH s 96 %-tnim etanolom u tikvici od 10 mL, od ove otopine se prije rada pripremi svježa 0,1 mM otopina

DPPH reagensa tako da se u tikvicu od 100 mL otpipetira 1 mL originalne otopine i do oznake nadopuni 96 %-tnim etanolom.

#### Postupak određivanja:

Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih dipeptida **1 - 12** određivala se pri koncentraciji  $c = 1\text{mM}$ . U epruvete se otpipetira 2 mL 96%-tnog etanola te 60  $\mu\text{L}$  pripremljenih otopina dipeptida nakon čega se dodaje 2 mL svježe pripremljene 0,1 mM otopine DPPH reagensa. Slijepa proba priprema se prema prethodno opisanom postupku pri čemu se umjesto otopina dipeptida dodaje otapalo (DMSO). Sadržaj epruvete se homogenizira na vibromješaču nakon čega slijedi inkubacija u tami na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Po završetku inkubacije, sposobnost antioksidanasa da reduciraju DPPH radikal, prati se mjerenjem promjene apsorbancije pri 517 nm. Kao standardna otopina uzima se 0,5 mM Trolox. Mjerenje se provodilo u dva ponavljanja te je za prikazivanje rezultata korištena aritmetička sredina dobivenih vrijednosti mjerenja.

#### Račun:

Antioksidacijska aktivnost (% inhibicije DPPH radikala) pri  $\lambda = 517\text{ nm}$  izračunata je prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

gdje je:

$A_0$  – apsorbancija slijepe probe

$A_t$  - apsorbancija reakcijske smjese nakon 30 minuta (t)

#### 3.2.4. Obrada podataka

Obrada podataka provedena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti pomoću FRAP i DPPH metode, antioksidacijska aktivnost ispitana je u dvije paralele te je izračunata srednja vrijednost.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Biološka evaluacija sintetiziranih dipeptida **1 - 12** provedena je određivanjem njihove potencijalne antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti. U svrhu istraživanja antimikrobne aktivnosti korištena je disk difuzijska metoda, a spojevima koji su pokazali antimikrobno djelovanje prema određenim mikrobnim vrstama određena je minimalna inhibitorna koncentracija. Dodatno za spoj **8** procjena antimikrobne aktivnosti određena je i metodom brojanja kolonija. Antioksidacijska aktivnost istražena je FRAP i DPPH metodama.

### **4.1. ANALIZA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**

U svrhu istraživanja antimikrobne aktivnosti sintetiziranih dipeptida korištena je disk difuzijska metoda. Rezultati su prikazani u tablici 10 za gram-pozitivne bakterije, tablici 11 za gram-negativne bakterije dok su rezultati za bakterije mliječne kiseline i kvasce izostavljeni jer prema njima nije zapažena antimikrobna aktivnost testiranih dipeptida. Također, rezultati su prikazani na slikama 8 i 9.



**Tablica 10.** Promjeri zone inhibicije rasta test mikroorganizama, gram-pozitivnih bakterija nastalih primjenom sintetiziranih dipeptida

Uzorak (1 mg/disk)	Promjer zone inhibicije (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>1</b>	-	-	-	-
<b>2</b>	-	-	-	-
<b>3</b>	-	-	-	-
<b>4</b>	-	8	-	-
<b>5</b>	-	-	-	-
<b>6</b>	-	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-	-
<b>8</b>	16	16	-	-
<b>9</b>	-	-	-	-
<b>10</b>	-	-	-	-
<b>11</b>	-	-	-	-
<b>12</b>	14	14	-	-
Kanamycin 0,25 mg	25	25	16	12
DMSO	-	-	-	-

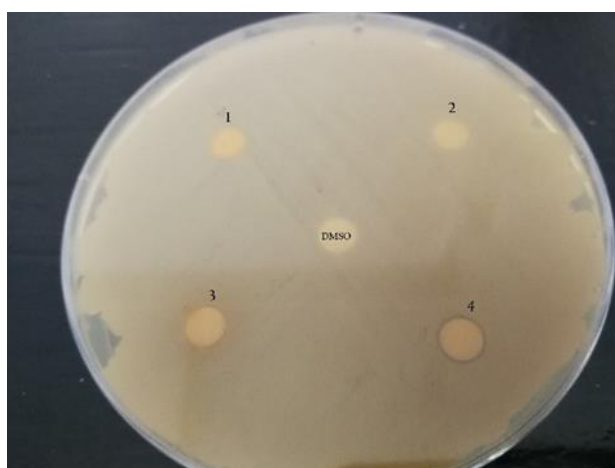
**Tablica 11.** Promjeri zone inhibicije rasta test mikroorganizama, gram-negativnih bakterija nastalih primjenom sintetiziranih dipeptida

Uzorak (1 mg/disk)	Promjer zone inhibicije (mm)		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i> s. Typhimurium
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	-	-	-
<b>3</b>	-	-	-
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	-	-	-
<b>6</b>	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-
<b>8</b>	19	-	-
<b>9</b>	-	-	-
<b>10</b>	-	-	-
<b>11</b>	-	-	-
<b>12</b>	14	-	-
Kanamycin 0,25 mg	29	17	21
DMSO	-	-	-

Iz rezultata je vidljivo kako je inhibicijsko djelovanje testiranih dipeptida prema test mikroorganizmima utvrđeno samo za tri od dvanaest testiranih dipeptida: **4, 8 i 12**. Ovi dipeptidi pokazali su antimikrobnu aktivnost samo prema test mikroorganizmima: *S. aureus*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa*.



**Slika 8.** Antimikrobna aktivnost testiranih spojeva **8** i **12** odnosno zone inhibicije rasta testiranih mikrobnih vrsta *P. aeruginosa* (Pa), *B. subtilis* (Bs) i *S. aureus* (Sa) (K - kanamicin 0,25 mg/disk – pozitivna kontrola, DMSO 10  $\mu$ L/disk – negativna kontrola)



**Slika 9.** Antimikrobna aktivnost spojeva **1**, **2**, **3** i **4** prema bakteriji *B. subtilis* odnosno zona inhibicije rasta bakterije *B. subtilis* spojem **4** (DMSO 10  $\mu$ L/disk – negativna kontrola)

Izostanak inhibicijske zone oko dijagnostičkih diskova ukazuje na rezistentnost testiranog mikroorganizma prema apliciranom dipeptidu.

Dodatno *in vitro* istraživanje antimikrobne aktivnosti dipeptida **4**, **8** i **12** provedeno je mikrodilucijskim postupkom, tj. metodom razrjeđivanja hranjivog bujona uz određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIC). Vrijednosti određene spektrofotometrijski, na valnoj duljini 660 nm, prikazane su u tablici 12. Minimalne inhibitorne koncentracije koje proizlaze iz rezultata prikazanih u tablici 12 prikazane su tablicom 13.

**Tablica 12.** Izmjerene apsorbance otopina test mikroorganizama primjenom različitih koncentracija sintetiziranih dipeptida

	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>C</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	
	<b>1 mM</b>	<b>0,5 mM</b>	<b>0,25 mM</b>	<b>0,125 mM</b>	<b>Sp</b>	<b>Sp</b>	<b>Sp</b>	
<i>S. aureus</i>	<b>4</b>	0,128	0,208	0,212	0,22	0,241	0,225	0,221
<i>S. aureus</i>	<b>8</b>	0,008	0,102	0,166	0,154	0,153	0,144	0,284
<i>S. aureus</i>	<b>12</b>	0,108	0,144	0,154	0,206	0,17	0,145	0,231
DMSO		0,2590	0,2500	0,2500	0,2180	0,2040	0,2300	0,2950
<b>Kanamycin</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>3,125</b>				
<b>koncentracija</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>Sp</b>	<b>Sp</b>	<b>Sp</b>	
Kanamycin		0,0580	0,0590	0,0560	0,0560	0,2320	0,2840	0,3140
<i>B. subtilis</i>	<b>4</b>	0,507	0,582	0,46	0,509	0,556	0,45	0,549
<i>B. subtilis</i>	<b>8</b>	0,03	0,31	0,919	0,542	0,5	0,457	0,546
<i>B. subtilis</i>	<b>12</b>	0,313	0,656	0,459	0,474	0,5	0,488	0,454
DMSO		0,5580	0,5730	0,5870	0,6040	0,6450	0,5150	0,5760
<b>Kanamycin</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>3,125</b>	<b>1,56</b>	<b>0,78</b>		
<b>koncentracija</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>Sp</b>	
Kanamycin		0,0530	0,0540	0,0550	0,0550	0,0580	0,6470	0,6310
<i>P. aeruginosa</i>	<b>4</b>	0,296	0,37	0,392	0,4	0,362	0,399	0,523
<i>P. aeruginosa</i>	<b>8</b>	0,061	0,099	0,283	0,279	0,246	0,3	0,358
<i>P. aeruginosa</i>	<b>12</b>	0,23	0,279	0,287	0,299	0,369	0,389	0,365
DMSO		0,4340	0,3960	0,3410	0,3670	0,3930	0,3760	0,4040
<b>Kanamycin</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>3,125</b>	<b>1,56</b>	<b>0,78</b>		
<b>koncentracija</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>µg/mL</b>	<b>Sp</b>	
Kanamycin		0,0580	0,0570	0,0520	0,0530	0,0530	0,0530	0,4260
Spoj <b>4</b>		0,1450	0,0700	0,0620	0,0570	0,0550	0,0530	0,0500
Spoj <b>8</b>		0,0950	0,0720	0,0610	0,0580	0,0550	0,0550	0,0500
Spoj <b>12</b>		0,0690	0,0670	0,0670	0,0600	0,0560	0,0530	0,0530

**Tablica 13.** Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) spojeva **4**, **8** i **12** na osnovu rezultata iz tablice 12

Spoj	Test mikroorganizam	MIC (mM)
Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe ( <b>4</b> )	<i>S. aureus</i>	> 1
	<i>B. subtilis</i>	> 1
	<i>P. aeruginosa</i>	> 1
Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe ( <b>8</b> )	<i>S. aureus</i>	= 1
	<i>B. subtilis</i>	= 1
	<i>P. aeruginosa</i>	= 1
Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe ( <b>12</b> )	<i>S. aureus</i>	> 1
	<i>B. subtilis</i>	> 1
	<i>P. aeruginosa</i>	> 1

Uspoređivanjem rezultata dobivenih istraživanjem u ovom radu i rezultata dobivenih istraživanjem koje su proveli Albada i Metzler-Nolte (2017), a koji su navedeni u tablici 1, vidljivo je da su MIC vrijednosti spojeva FcC(O)-WRWRW-NH<sub>2</sub>, RcC(O)-WRWRW-NH<sub>2</sub> i OcC(O)-WRWRW-NH<sub>2</sub> 10<sup>2</sup> do 10<sup>3</sup> puta manje od MIC vrijednosti koje su pokazali spojevi Ac-D-Val-NH-Fn-COOMe (**4**), Ac-D-Leu-NH-Fn-COOMe (**8**) i Ac-D-Phe-NH-Fn-COOMe (**12**).

Također, uspoređivanjem rezultata dobivenih istraživanjem u ovom radu i rezultata dobivenih istraživanjem koje su proveli Chantson i suradnici (2006), a koji su navedeni u tablici 2, vidljivo je da su MIC vrijednosti spojeva Cc<sup>+</sup>CO-RWRWRW-NH<sub>2</sub>, FcCO-WRWRW-NH<sub>2</sub> i FcCO-RWRWRW-NH<sub>2</sub> 10 do 10<sup>3</sup> puta manje od MIC vrijednosti koje su pokazali spojevi sintetizirani i testirani u ovom radu.

Gram-negativna bakterija *P. aeruginosa* jedan je od mikroorganizama na kojem su provedena sva tri istraživanja te je iz rezultata vidljivo kako su spojevi sintetizirani u istraživanju Albadae i Metzler-Noltea te Chantson i suradnika učinkovitiji u njenom suzbijanju za dva do tri decimalna razrjeđenja. Važno je naglasiti kako s uspoređivanjem MIC vrijednosti različitih izvora, zbog različitih sojeva bakterija, medij za rast te drugih parametara ispitivanja treba biti oprezan (Chantson i sur., 2006).

U cilju detaljnijeg istraživanja antimikrobne aktivnosti spoja **8** provedeno je brojanje naraslih kolonija bakterije *P. aeruginosa* nakon djelovanja spoja u koncentracijama od 0,25 mM do 2 mM te su rezultati prikazani u tablici 14. Tablicom 15 i slikama 10 i 11 prikazan je eksperiment proveden na proširem broju mikroorganizama uz djelovanje spoja **8** koncentracije 2 mM nakon 24 sata.

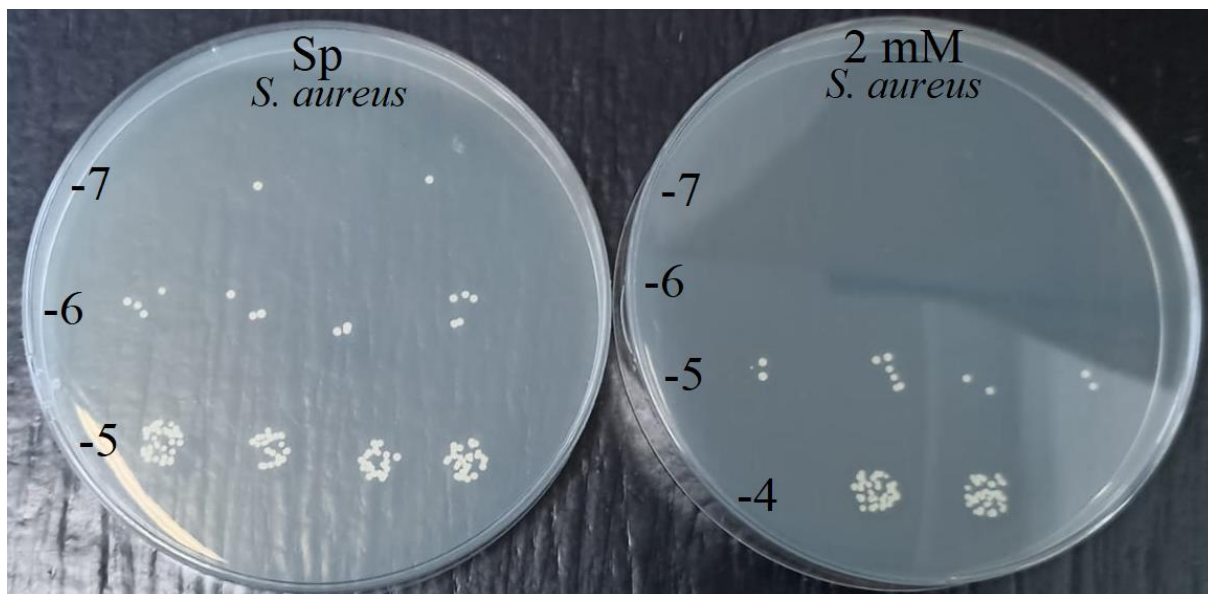
**Tablica 14.** Broj živih stanica bakterije *P. aeruginosa* kroz period od 24 sata uzgoja uz djelovanje spoja **8** različitih koncentracije te bez djelovanja spoja izražen kao log CFU (CFU = broj kolonija / volumen uzorka \*recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja)

Sat	Slijepa proba	0,25 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM
0	5,34	5,34	5,34	5,34	5,34
1,5	5,75	5,78	5,78	5,70	5,60
3	6,65	6,54	6,43	6,18	5,81
8	8,48	8,30	8,00	7,32	6,76
24	9,48	9,72	9,60	8,70	8,18

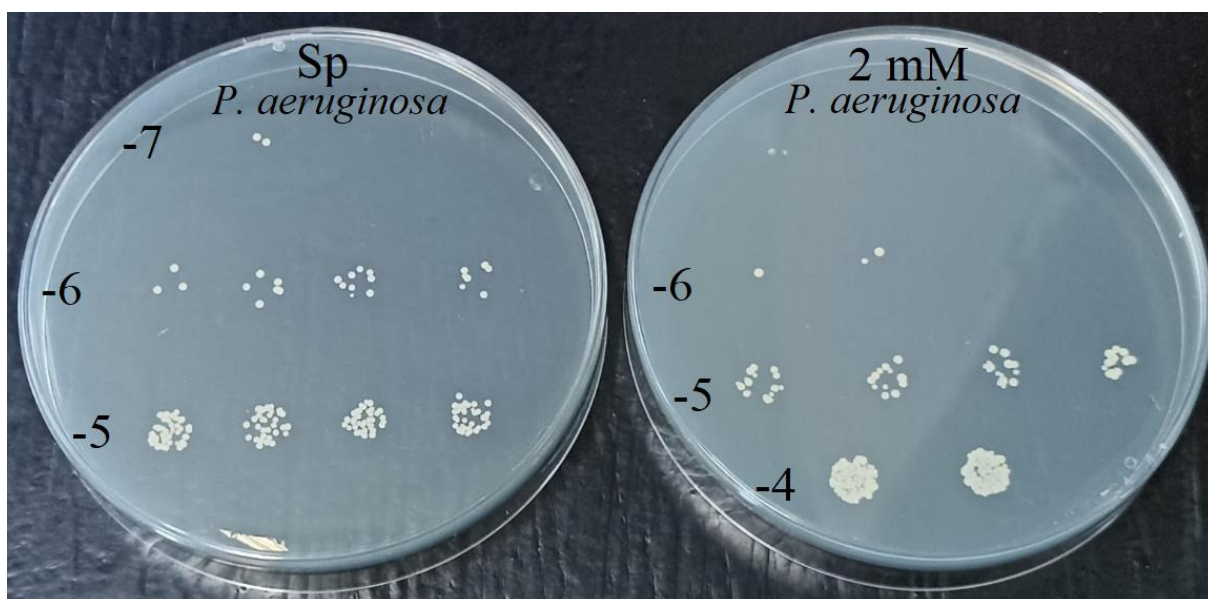
**Tablica 15.** Broj živih stanica bakterija *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *B. subtilis* nakon 24 sata uzgoja uz djelovanje spoja **8** koncentracije 2 mM te broj živih stanica nakon 24 sata uzgoja bez djelovanja spoja **8** izražen kao log CFU (CFU = broj kolonija / volumen uzorka \*recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja)

Sat	Mikroorganizam	Slijepa proba	2 mM
24	<i>S. aureus</i>	8,54	7,48
	<i>P. aeruginosa</i>	9,3	8,18
	<i>B. subtilis</i>	9,37	8,23

Uzorci primjenjeni u najvišoj testiranoj koncentraciji uzrokuju inhibiciju rasta mikroorganizama za jedno decimalno razrjeđenje.



**Slika 10.** Usporedba broja stanica bakterije *S. aureus* nakon 24 sata uzgoja u uzorku bez spoja i uz prisustvo 2 mM spoja **8**



**Slika 11.** Usporedba broja stanica bakterije *P. aeruginosa* nakon 24 sata uzgoja u uzorku bez spoja i uz prisustvo 2 mM spoja **8**

## 4.2. ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Antioksidacijska aktivnost se najčešće izražava TEAC-vrijednošću (Trolox equivalent antioxidant activity) koja je definirana kao mM koncentracija otopine, hidrosolubilnog analoga vitamina E, Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), ekvivalentne antioksidacijske aktivnosti kao i 1 mM otopina ispitivanog uzorka (Prior i sur., 2005). U tablici 16 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti sintetiziranih dipeptida određeni FRAP metodom, izraženi kao mM standarda Troloxa.

**Tablica 16.** Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih dipeptida određena FRAP metodom

Testirani spojevi (c = 1 mM)	A1	A2	ΔA	Antioksidacijska aktivnost (mM Trolox-a)
1	2,173	2,155	2,164	2,161 ± 0,013
2	0,59	0,577	0,584	0,587 ± 0,009
3	2,169	2,19	2,180	2,177 ± 0,015
4	2,295	2,299	2,297	2,293 ± 0,003
5	2,284	2,276	2,280	2,276 ± 0,006
6	0,715	0,721	0,718	0,72 ± 0,004
7	2,219	2,214	2,217	2,214 ± 0,004
8	1,779	1,778	1,779	1,777 ± 0,001
9	1,629	1,63	1,630	1,629 ± 0,001
10	1,071	1,114	1,093	1,094 ± 0,030
11	2,003	2,002	2,003	2 ± 0,001
12	2,228	2,236	2,232	2,229 ± 0,006

Prema rezultatima dobivenim provedbom FRAP metode vidljivo je kako najjaču antioksidacijsku aktivnosti imaju spojevi **4**, **5** i **12**, a najslabiju spojevi **2** i **6**.

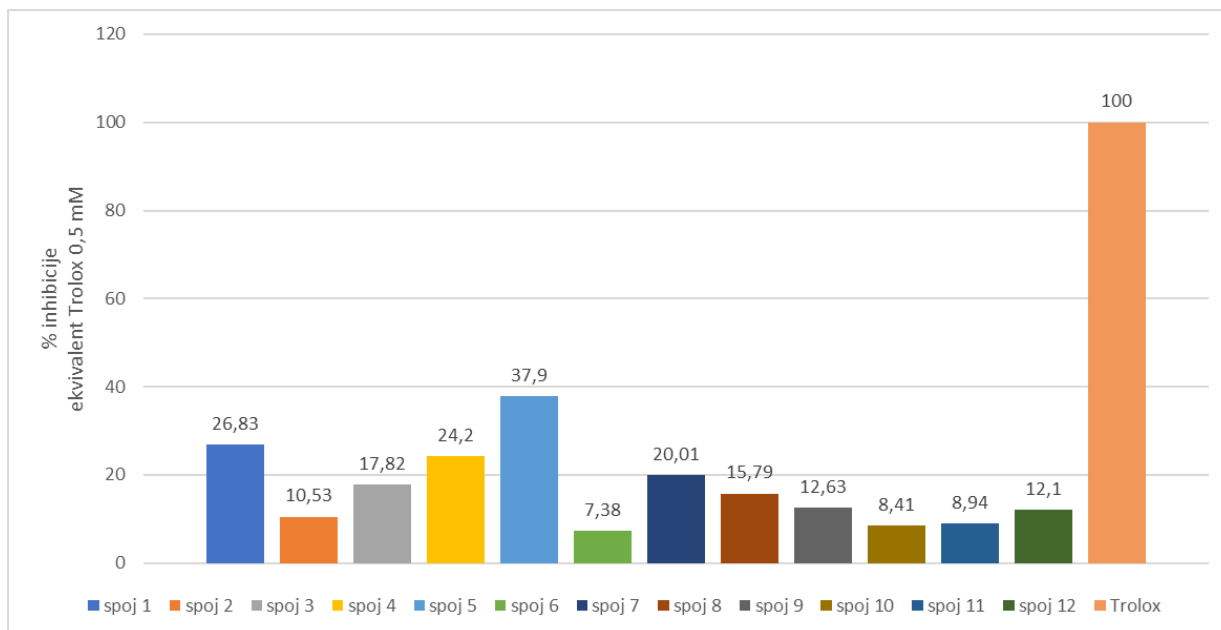
Antioksidacijska aktivnost dodatno je istražena pomoću DPPH metode. Rezultati ove metode prikazani su u tablici 17.



**Tablica 17.** Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih dipeptida određena DPPH metodom

<b>Testirani spojevi (c = 1 mM)</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b><math>\Delta A</math></b>	<b>% inhibicije</b>
<b>1</b>	0,38	0,393	0,387	11,64
<b>2</b>	0,42	0,416	0,418	4,57
<b>3</b>	0,402	0,406	0,404	7,76
<b>4</b>	0,388	0,395	0,392	10,5
<b>5</b>	0,371	0,36	0,366	16,44
<b>6</b>	0,428	0,42	0,424	3,2
<b>7</b>	0,393	0,406	0,400	8,68
<b>8</b>	0,405	0,41	0,408	6,85
<b>9</b>	0,426	0,402	0,414	5,48
<b>10</b>	0,429	0,415	0,422	3,65
<b>11</b>	0,422	0,419	0,421	3,88
<b>12</b>	0,422	0,408	0,415	5,25
Trolox 0,5 mM	0,24	0,256	0,248	43,38

DPPH metodom dobiveno je da najveću antioksidativnu aktivnost tj. postotak inhibicije imaju spojevi **1**, **4** i **5**. Na slici 12 grafički je prikazana antioksidacijska aktivnost svih sintetiziranih dipeptida izražena kao % inhibicije ekvivalentan 0,5 mM Troloxu.



**Slika 12.** Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih dipeptida **1 - 12** određena DPPH metodom i izražena kao % inhibicije ekvivalentan 0,5 mM Troloxu

## 5. ZAKLJUČCI

1. Od dvanaest testiranih dipeptida prilikom preliminarnog određivanja antimikrobne aktivnosti, disk difuzijskom metodom, rast gram-pozitivnih bakterija: *B. subtilis* i *S. aureus* te gram-negativne bakterije *P. aeruginosa* inhibirali su dipeptidi **4**, **8** i **12**.
2. Za dipeptide **4**, **8** i **12** određena je minimalna inhibitorna koncentracija prema testiranim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama koja je znatno viša u odnosu na literaturne podatke za slične spojeve i iste test mikroorganizme
3. Metodom brojanja kolonija određeno je da dipeptid **8** primjenjen u najvišoj testiranoj koncentraciji (2 mM) uzrokuje inhibiciju rasta gram-pozitivnih bakterija: *B. subtilis* i *S. aureus* te gram-negativne bakterije *P. aeruginosa* za jedno decimalno razrjeđenje.
4. Pokazalo se da kiralnost (desno orijentirane aminokiseline) kao i manja zaštitna skupina (acetil) imaju utjecaja na biološku aktivnost, budući da su dipeptidi **4**, **8** i **12** pokazali bolju antimikrobnu aktivnost u odnosu na druge testirane dipeptide.
5. Antioksidacijska aktivnost testiranih dipeptida prema FRAP metodi bila je u rasponu od  $0,587 \pm 0,009$  mM Trolox-a do  $2,293 \pm 0,003$  mM Trolox-a. Najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazao je dipeptid **4** i ona iznosi  $2,293 \pm 0,003$  mM Trolox-a. Antioksidacijska aktivnost dipeptida **12** iznosi  $2,229 \pm 0,006$  mM Trolox-a, odnosno  $1,777 \pm 0,001$  mM Trolox-a za dipeptid **8**.
6. Prema rezultatima DPPH metode, testirani dipeptidi u koncentraciji 1 mM imaju antioksidacijsku aktivnost u rang 7 – 38 % antioksidacijske aktivnosti 0,5 mM Trolox-a. Najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazao je dipeptid **5** i ona iznosi 37,9 % antioksidacijske aktivnosti 0,5 mM Trolox-a, dok je najnižu antioksidacijsku aktivnost pokazao dipeptid **6** i ona iznosi 7,38 % antioksidacijske aktivnosti 0,5 mM Trolox-a. Antioksidacijska aktivnost dipeptida **4** iznosi 24,2 % antioksidacijske aktivnosti 0,5 mM Trolox-a, odnosno 15,79 % i 12,1 % antioksidacijske aktivnosti 0,5 mM Trolox-a za dipeptide **8** i **12**.

## 6. LITERATURA

- Albada B, Metzler-Nolte N (2017) Highly Potent Antibacterial Organometallic Peptide Conjugates. *Acc. Chem. Res.* **50**: 2510–2518. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00282
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **6**: 71–79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Barišić L (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* **5**: 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
- Blake KS, Choi J, Dantas G (2021) Approaches for characterizing and tracking hospital-associated multidrug-resistant bacteria. *Cell Mol Life Sci* **78**: 2585-2606 doi: 10.1007/s00018-020-03717-2
- Brainina K, Stozhko N, Vidrevich M (2019) Antioxidants: Terminology, Methods, and Future Considerations. *Antioxidants* **8**: 297. doi: 10.3390/antiox8080297
- Chantson JT, Verga Falzacappa MV, Crovella S, Metzler-Nolte N (2006) Solid-Phase Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activities of Metallocene–Peptide Bioconjugates. *ChemMedChem* **1**: 1268-1274. doi: 10.1002/cmdc.200600117
- Daniluk M, Buchowicz W, Koszytkowska-Stawińska M, Jarzabek K, Jarzemska KN, Kamiński R, Piszcz M, Laudy AE, Tyski S (2019) Ferrocene Amino Acid Ester Uracil Conjugates: Synthesis, Structure, Electrochemistry and Antimicrobial Evaluation. *ChemistrySelect* **4**: 11130-11135. doi: 10.1002/slct.201902518
- De Hatten X, Weyhermuller T, Metzler-Nolte N (2004). Ferrocenoyl peptides with sulfur-containing side chains: synthesis, solid state and solution structures. *J. Organomet. Chem.* **689**: 4856-4867. doi: 10.1016/j.jorganchem.2004.10.002
- Deshayes S, Xian W, Schmidt NW, Kordbacheh S, Lieng J, Wang J, Zарmer S, St. Germain S, Voyen L, Thulin J, Wong GCL, Kasko AM (2017) Designing Hybrid Antibiotic Peptide Conjugates To Cross Bacterial Membranes. *Bioconjug Chem* **28**: 793–804. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00725

- Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM (2016) Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**: 1–44. doi: 10.1155/2016/1245049
- Fouda MFR, Abd-Elzaher MM, Abdelsamaia RA, Labib AA (2007) On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl. Organometal. Chem* **21**: 613–625. doi: 10.1002/aoc.1202
- Gupta D (2015) Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *Int J Pharm Sci Res* **6**: 546-566. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66
- Harris IS, DeNicola GM (2020) The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol* **30**: 440-451. doi: 10.1016/j.tcb.2020.03.002
- Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B (2019) Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* **51**: 72-80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008
- Ivančić M, Kovač G (2021) Sinteza, konformacijska analiza i biološka evaluacija dipeptida izvedenih iz ferrocena-1,1'-diamina s Ala-Pro sekvencom. Rad za rektorovu nagradu. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno - biotehnološki fakultet, Zagreb
- Jerić I (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kem. Ind.* **53**: 495-504.
- Kapoor G, Saigal S, Elongavan A (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol* **33**: 300–305. doi: 10.4103/joacp.JOACP\_349\_15
- Kovačević M (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Zagreb
- Liu ZQ (2011) Potential Applications of Ferrocene as a Structural Feature in Antioxidants. *Mini Rev Med Chem* **11**: 345–358. doi: 10.2174/138955711795305326
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phcog Rev* **4**: 118-126. doi: 10.4103/0973-7847.70902
- McFarland J (1907) Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA* **14**: 1176-1178. doi: 10.1001/jama.1907.25320140022001f

- Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K (2014) A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int* **2014**: 186864. doi: 10.1155/2014/186864
- Moon JK, Shibamoto T (2009) Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 1655–1666. doi: 10.1021/jf803537k
- Moriuchi T, Hirao T (2006) Ferrocene–Peptide Bioconjugates. U: Simonneaux g. (ured.) Bioorganometallic Chemistry. Topics in Organometallic Chemistry, 17 izd., Springer Berlin, Heidelberg, str. 143–175.
- Ong YC, Gasser G (2019) Organometallic compounds in drug discovery: Past, present and future. *Drug Discov. Today Technol* **37**: 117-124. doi: 10.1016/j.ddtec.2019.06.001
- Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* **1**: 1-12. doi: 10.1038/s41570-017-0066
- Paul C, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L (2006) Anti-infective potencial of natural products: How to develop a stronger „proof of concept“. *J Ethnopharmacol* **106**: 290-302. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.003
- Pauson PL (2001) Ferrocene-how it all began. *J. Organomet. Chem.* **637**: 3–6. doi: 10.1016/s0022-328x(01)01126-3
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **53**: 4290-4294. doi: 10.1021/jf0502698
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I (2014) Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta* **436**: 332–347. doi: 10.1016/j.cca.2014.06.004
- Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija, *Kem. Ind.* **60**: 61–79.
- Reese HR, Shanahan CC, Proulx C, Menegatti S (2020) Peptide science: a ”rule model” for new generations of peptidomimetics. *Acta Biomater.* **102**: 35-74. doi: 10.1016/j.actbio.2019.10.045

- Saleem M, Yu H, Wang L, Zain-ul-Abdin, Khalid H, Akram M, Abbasi NM, Huang J (2015) Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing. *An al Chim Act* **876**: 9–25. doi: 10.1016/j.aca.2015.01.012
- Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR (2006) Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotechnol* **17(6)**: 638–642. doi: 10.1016/j.copbio.2006.10.002
- Sijongesonke P, Aderibigbe BA (2019) Ferrocene - Based Compounds with Antimalaria/Anticancer Activity. *Molecules* **24**: 3604. doi:10.3390/molecules24193604
- Sundqvist M (2014) Reversibility of antibiotic resistance. *Ups J Med Sci* **119**: 142–148. doi: 10.3109/03009734.2014.903323
- Woolhouse MEJ, Ward MJ (2013) Microbiology. Sources of Antimicrobial Resistance. *Science* **341**: 1460–1461. doi: 10.1126/science.1243444

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (ANA MIKULIĆ) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis