

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

**Институт по микробиология «Стефан Ангелов», Департамент по
Обща микробиология, Секция «Микробна биохимия»**

.....

....

Ирина Вадим Лазаркевич

**АНТИМИКРОБЕН ПОТЕНЦИАЛ НА СИНТЕТИЧНИ АНАЛОЗИ
НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА И
КОМБИНИРАНОТО ИМ ДЕЙСТВИЕ С РАМНОЛИПИД-
БИОСЪРФАКТАНТ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

За присъждане на образователна и научна степен «Доктор»

Научен ръководител:

доц., д-р Данка Гълъбова

Професионално направление 4.3. «Биологични науки»

Научна специалност 01.06.12 «Микробиология»

София, 2019

Индекс на използваните съкращения

AST (Antimicrobial Susceptibility Testing) – оценка на чувствителност към антибиотици

BCAA (branched-chain amino acids) – аминокиселини с разклонена верига

BCFAs (branched-chain fatty acids) – мастни киселини с разклонена верига

CC50 (cytotoxic concentration) – цитотоксична концентрация 50

CFU (colony forming units) – формиращи колонии единици

CL (cardiolipin) - дифосфатидилглицерол (кардиолипин)

CLSM (confocal laser scanning microscopy) – конфокална лазерна сканираща микроскопия

CMC (critical micelle concentration) – критична концентрация на мицелообразуване

CodY - глобален транскрипционен регулатор при *Bacillus subtilis*

DAS, DADS, DATS – диалил сулфид, диалил дисулфид, диалил трисулфид

ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases) - широкоспектърни бета-лактамази

ETS - S-етил-4-аминобензентиосулфонат

FIC (fractional inhibitory concentration) – фракционна инхибиторна концентрация

FICI (fractional inhibitory concentration index) – индекс на фракционна инхибиторна концентрация

Glu – глутамат, **pGlu** – пироглутамат

GTP – гуанозин-3-фосфат

GSH – глутатион, **GSSG** - глутатион-дисулфид

ILV (isoleucine, leucine, valine) – изолевцин, левцин, валин

LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) – течна хроматография/мас-спектрометрия

LD50 (lethal dose) – летална доза 50

LPG (lysyl-phosphatidylglycerol) - лизилфосфатидилглицерол

LPS (lipopolysaccharides)– липополизахариди

Lub 4, Lub 5, Lub 6 – 1,4-нафтохинонови производни

MIC(s) (minimal inhibitory concentration) - минимална инхибиторна концентрация

MBC(s) (minimal bactericidal concentration) - минимална бактерицидна концентрация

MDR (multi drug resistant) – щамове с мултилекарствена резистентност

MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) – метицилин резистентни *S. aureus*

MTS - S-метил-4-аминобензентиосулфонат

MTT - {3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолов бромид}

OD (optical density) – оптическа плътност

OMPs (outer membrane proteins) – външномембранни протеини

OSCs (organosulfur compounds) - органосерни съединения

PG (phosphatidylglycerol) - фосфатидилглицерол

PE (phosphatidylethanolamine) – фосфатидилетаноламин

Pro (proline) - пролин

RL - рамнолипид – биосърфактант

ROS (reactive oxygen species) – свободни кислородни радикали

SEM (scanning electron microscopy) – сканираща електронна микроскопия

VRE (vancomycin resistant *Enterococcus*) - ванкомицин-резистентни *Enterococcus spp*

Увод

Увеличаващият се брой микроорганизми, неподатливи на третиране с одобрените лекарствени препарати е сериозен здравен проблем с нарастваща обществена значимост. Появата на патогенни щамове, толерантни дори към антибиотици от последно поколение изостря необходимостта от откриване и разработване на нови фармацевтични средства с широк спектър на активност. Силно належащо е разширяването на терапевтичния контингент с нови попълнения, отговарящи на изискванията за висока ефективност, слаба токсичност и ниска себестойност.

Преосмислянето на стратегиите за ограничаване на антибиотичната резистентност включва разгръщане на потенциала на комбинаторната химия за идентифициране на нови ефикасни субстанции – синтетични или природни. Растенията са богат източник на вторични метаболити с различни химични структури, които използват като защита срещу патогенна инвазия. В съвременната фармацевтична индустрия, натуралните продукти продължават да бъдат основен ресурс за генериране на водещи субстанции.

Настоящото изследване е фокусирано върху изясняване на антимикробния потенциал на две групи химични съединения - синтетични производни на биологично активни вещества с растителен произход. Тиосулфинатите (R_1SOSR_2) в състава на видовете от р. *Allium* имат мощен антимикробен потенциал, най-силно изразен при алицина ($CH_2=CH-CH_2SOSCH_2-CH=CH_2$). Високата реактивност и химическа нестабилност ограничават тяхната приложимост. Естерите на тиосулфоновата киселина ($R_1SO_2SR_2$) са структурни аналози на фитонцидите в чесъна (*Allium sativa*). За разлика от природната антибиотична субстанция, синтетичните алицинови биомиметици, наречени псевдоалицин, са химически стабилни съединения със запазена или подобрена антимикробна активност и ниска токсичност.

Съединенията с 1,4-нафтохинонова структура са широко разпространени в природата, като най-голямо е разнообразието сред висшите растения. Някои

естествени 1,4-нафтохинони, например: лаузон (*Lawsonia inermis*); плумбагин (*Plumbago scandens*); юглон (р. *Juglans*); лапахол (*Tabebuia* sp., *Tecoma* sp.) и др., от векове намират широко приложение в традиционните лечителски практики благодарение на широкия спектър от биологични активности: антитуморна, антимикробна, антивирусна, антипаразитна и антитромбоцитна. Усиленото търсене на субстанции с ценни фармакологични свойства е довело до създаването на огромно структурно разнообразие от синтетични 1,4-нафтохинонови деривати. Тяхната биологична активност зависи от вида и разположението на заместените групи и може да бъде модифицирана.

Употребата на комбинации от медикаменти осигурява по-добри клинични резултати от монотерапиите и придобива все по-широко признание в борбата с мултилекарствената резистентност. Изхождайки от презумпцията, че биосърфактантите провокират промени в мембранната организация на бактериалната клетка, което води до улеснен достъп на антимикробни агенти до нея, изследователският интерес е насочен към възможността за подобряване на антимикробната активност на синтетичните тиосулфонилови и 1,4-нафтохинонови производни чрез добавяне на рамнолипид – биосърфактант.

Цел и задачи

Цел:

Оценка на антимикробната активност на синтетични тиосулфонил- и 1,4-нафтохинон- производни, приложени самостоятелно и в комбинация с рамнолипид – биосърфактант, както и изследване на техните потенциални механизми на действие.

За постигане на целта бяха формулирани следните задачи:

1. Определяне на MIC и MBC на метилтиосулфонат (MTS) и етилтиосулфонат (ETS) при моделни щамове Грам (+) и Грам (-) бактерии
2. Определяне на MIC и MBC на 1,4 – нафтохинони (Lub 4, Lub 5 и Lub 6) при моделни щамове Грам (+) и Грам (-) бактерии
3. Изследване на комбинирания ефект на изпитваните синтетични аналози и рамнолипид - биосърфактант (RL)
4. Оценка на бактерицидния капацитет (MBC/MIC) на проучваните синтетични аналози и определяне на степента им на взаимодействие в комбинация с RL въз основа на FICI.
5. Изследване на комбинирания ефект на двете групи проучвани синтетични аналози
6. Оценка на антибиотичната чувствителност на изпитваните щамове
7. Оценка на цитотоксичния ефект на изследваните синтетични тиосулфонил- и 1,4- нафтохинон- производни върху клетъчни линии
8. Проучвания върху повърхностните клетъчни структури при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168
 - 8.1. Изследване на промените в пермеабилитета на клетките
 - 8.2. Изследвания върху фосфолипидния и белтъчен компонент на бактериалната мембрана на *Bacillus subtilis* 168 под въздействие на рамнолипид-биосърфактант

9. Микроскопски наблюдения върху клетъчната ултраструктура на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168 при въздействие с MTS и рамнолипид - биосърфактант, приложени самостоятелно и в комбинация

9.1. Конфокална лазерна сканираща микроскопия (CLSM)

9.2. Сканираща електронна микроскопия (SEM)

10. Изследване въздействието на MTS и RL, приложени самостоятелно и в комбинация върху клетъчния отговор на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168

Материали и методи

1. Материали

1.1. Микроорганизми

Експериментите са проведени с: *Bacillus subtilis* 168 CIMB, *Pseudomonas aeruginosa* 1390 NBIMCC, *Alcaligenes faecalis* 6132 NBIMCC, *Escherichia coli* 25922 ATCC и *Escherichia coli* W 1655 NBIMCC, поддържани върху Bacto agar (Difco) при 4°C и ежесмесечно препосиване.

1.2. Хранителна среда и условия за култивиране

Експерименталните култури са култивирани в минерална хранителна среда по Spizizen (1958) (pH 7.2) със следния състав: 0,2% (NH₄)₂SO₄; 0,6% KH₂PO₄; 0,1% Na₃(C₆H₅O₇).2H₂O; 0,01% MgSO₄; обогатена с CaCl₂, 2 mM; 0.5% казеин хидролизат (Fluka); 0.5% малтоза, при 37°C на клатчка 200 грm.

1.3. Синтетични аналози

1.3.1. Синтетични естери на тиосулфоновата киселина:

S-метил-4-аминобензентиосулфонат (MTS)

S-етил-4-аминобензентиосулфонат (ETS)

1.3.2. Синтетични 1,4-нафтохинонови производни:

S,S-ди-р-толил 1,4-диоксо-дихидронафтален-2,3-бис(сулфонотиат) – Lub 4

S,S-бис(4-ацетамидофенил)1,4-диоксо-дихидронафтален-2,3-бис(сулфонотиат) – Lub 5

S,S-бис(4-аминофенил) 1,4-диоксо-дихидронафтален-2,3-бис(сулфонотиат) - Lub 6.

1.4. Рамнолипид – биосърфактант (RL)

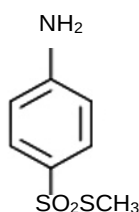
RL PS-17 е продуциран от *Pseudomonas* sp. PS-17 и е смес от два хомоложни рамнолипида – RL-1(α-L-рамнопиранозил- β-хидроксиалканоил- β-хидроксиалканоат) и RL-2 (2-O-α-L-рамнопиранозил-α-L-рамнопиранозил- β-хидроксиалканоил- β-хидроксиалканоат)

1.5. Клетъчни линии

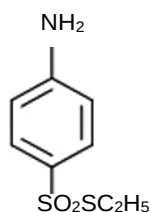
Експериментите са проведени с две клетъчни линии: Vero и HEp-2 (НБПМКК, София), култивирани в среда DMEM (Gibco BRL, USA) с 10% FBS, обогатена с 10 mM HEPES буфер (Merck, Germany) и антибиотици (penicillin, 100 IU/ml; streptomycin, 100 µg/ml), в CO₂ инкубатор (HERA cell 150, Heraeus, Germany) при 37°C/5% CO₂.

Фиг.1. Структурни формули на използваните химични съединения: а) тиосулфонил-производни (MTS, ETS); б) 1,4-нафтохинон- производни (Lub 4, Lub 5, Lub 6); в) рамнолипид – биосърфактант (RL):

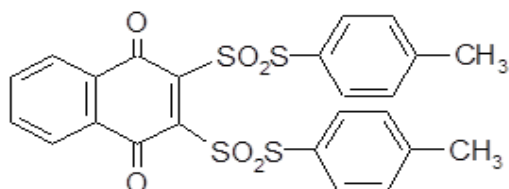
а) MTS



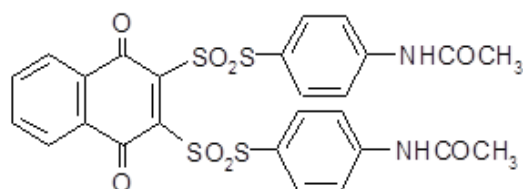
ETS



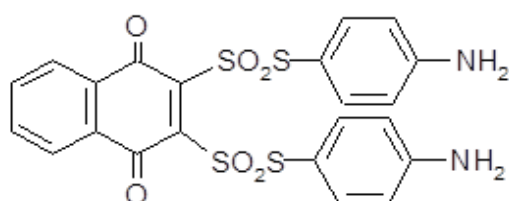
б) Lub 4



Lub 5

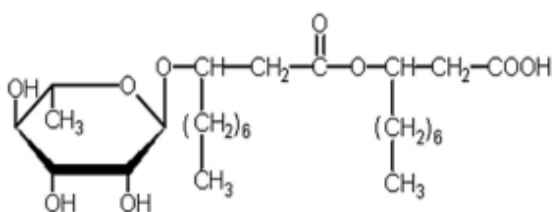


Lub 6

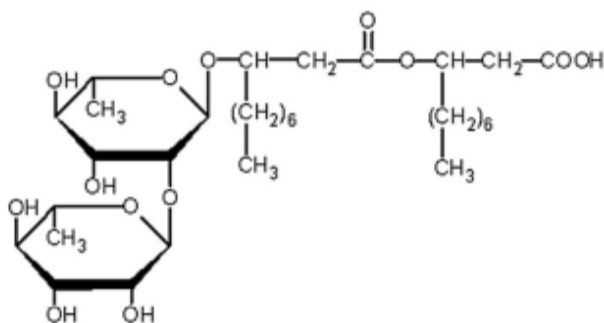


в)

Rhamnolipid RL-1



Rhamnolipid RL-2



2. Методи

2.1. Микробиологични методи

2.1.1. Определяне на минимална инхибираща концентрация (MIC) и максимална бактерицидна концентрация (MBC) - метод на постепенно разреждане

2.1.2. Измерване на оптичестката плътност (OD) - спектрофотометър при 570 nm.

2.1.3. Оценка на антибиотичната чувствителност на тестваните щамове (Antimicrobial Susceptibility Testing) - E-test градиентен дифузионен метод

2.2. Биохимични методи

2.2.1. Определяне на екстрацелуларен белтък - метод на Bradford (1976)

2.2.2. Оценка на цитотоксичност -MTT метод (Mosmann, 1983)

2.2.3. Екстракция и анализ на мембранни липиди - модифициран метод на Bligh и Dyer (1959), 2D-TLC

2.2.4. Екстракция и анализ на мембранни протеини - метод на Konings *et al.* (1973), SDS-PAGE

2.2.5. Газова хроматография и мас-спектрометрия (GS/MS)

2.3. Микроскопски методи

2.3.1. Конфокална лазерна сканираща микроскопия (CLSM)

2.3.2. Сканираща електронна микроскопия (SEM)

Резултати и обсъждане

1. Изследване влиянието на синтетични аналози на биологично активни вещества и техните комплекси с рамнолипид-биосърфактант (RL) върху растежа и повърхностните клетъчни свойства на моделни щамове Грам (+) и Грам (-) бактерии

За целите на настоящото изследване бяха подбрани щамове, принадлежащи към различни родове и таксономични групи, способни да предизвикват заболявания при човека и животните, както и увреждания в някои индустриални производства и селското стопанство.

Бактерицидното действие на веществата (самостоятелно и в комбинация с RL) беше оценявано чрез проследяване на бактериалния растеж на моделните щамове и определяне на минималната инхибиторна концентрация (MIC) и минималната бактерицидна концентрация (MBC). Комбинираното прилагане две вещества може да повлияе върху техните фармакокинетични характеристики и да доведе до засилване на бактерицидния ефект. Въпреки интензивните проучвания за приложение на биосърфактантите в различни области, данни за тяхното въздействие върху микробните клетки все още са непълни. Присъствието в хранителната среда на рамнолипид - биосърфактант PS-17 не влияе върху растежа на Грам (-) бактерии, но значително повишава клетъчния пермеабилитет, особено над СМС (Sotirova *et al.*, 2008; 2009). При Грам (+) щамове ефектът е различен: над СМС растежът е напълно инхибиран, а нивото на екстрацелуларния протеин се покачва при концентрации по-ниски или близки до СМС с максимум при $\leq 0.01\%$ (Sotirova *et al.*, 2008). Изхождайки от презумцията, че биосърфактантите провокират промени в организацията на бактериалната клетъчната мембрана, беше съставена хипотеза, че добавянето на рамнолипид - биосърфактант (RL) към изследваното вещество ще улесни достъпа му до микробната клетка и ще усили антибактериалното му действие.

Антимикробният потенциал на двете групи инхибитори беше изпитан в концентрационен диапазон от 1 $\mu\text{g/ml}$ до 120 $\mu\text{g/ml}$ – прилагани самостоятелно и в

комплекс с RL. За целите на настоящето изследване RL е прилаган в концентрация под CMC - 10 µg/ml.

Влиянието на инхибиторите и техните комплекси с рамнолипид-биосърфактант върху повърхностните клетъчни свойства е оценено посредством количеството екстрацелуларен белтък (Bradford, 1976).

1.1. Изследване влиянието на синтетични естери на тиосулфаниловата киселина (MTS и ETS)

1.1.1. Метилтиосулфонат (MTS)

1.1.1.1. Влияние на MTS и неговия комплекс с RL (MTS/RL) върху растежа и пермеабилитета на *Pseudomonas aeruginosa* 1390

Микробният растеж беше инхибиран 75% в сравнение с контролата при концентрация на MTS 50 µg/ml. MIC беше регистрирана при 70 µg/ml (фиг. 2а). Ефектът на веществото в тази концентрация е бактериостатичен ($0,253 \times 10^8$ CFU/ml). MBC_{MTS} беше отчетена при 80 µg/ml.

Съотношението между MIC и MBC служи за оценка на антимикробния потенциал на дадена субстанция върху съответния бактериален щам. Според възприетата скала за оценка на бактерицидния капацитет на веществата (Berche *et al.*, 1988) при MBC/MIC между 1 и 2, ефектът се счита за бактерициден, а при по-висока стойност – бактериостатичен. Съотношението между MBC и MIC на MTS при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 е 1,14, което позволява да се твърди, че MTS има бактерицидно действие при този щам (табл. 1).

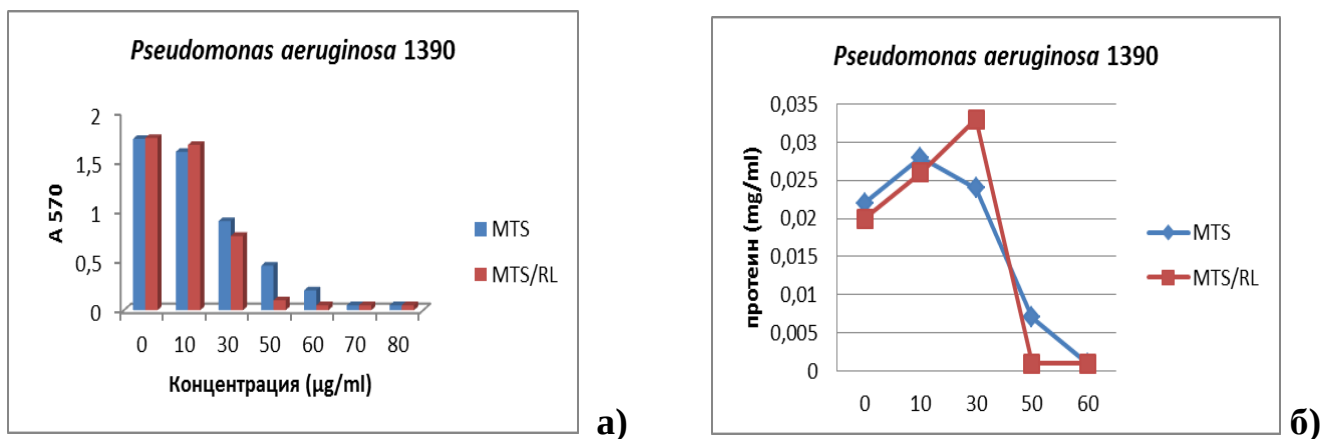
Редица автори (Cai *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2016) съобщават много по-висока MIC на алицина при някои щамове *Pseudomonas aeruginosa* (512 µg/ml) в сравнение с MICs, регистрирани при други патогени - *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* и *Candida albicans* (32 - 64 µg/ml). Констатираният резултат предполага по-голяма ефикасност на синтетичния алицинов аналог от природната субстанция при *Pseudomonas aeruginosa*.

Експерименталните данни потвърдиха хипотезата, че добавянето на рамнолипид – биосърфактант ще рефлектира върху ефекта на инхибиращия агент.

MTS в нелетална концентрация (30 $\mu\text{g/ml}$) в комбинация с RL силно редуцира бактериалния растеж (CFU/ml - $1,53 \times 10^8$) в сравнение със самостоятелното му прилагане (CFU/ml- $3,46 \times 10^8$). При третиране с 50 $\mu\text{g/ml}$ MTS без RL бяха изброени $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, докато в негово присъствие беше отчетено пълно инхибиране на растежа. Комбинираното действие на MTS/RL води до значително понижение на MIC (50 $\mu\text{g/ml}$) и в още по-голяма степен на MBC (50 $\mu\text{g/ml}$). Присъствието на рамнолипид – биосърфактант усилва инхибиращия ефект на MTS и повишава неговия антимикробен потенциал.

Изчисленият въз основа на установените MIC_{MTS} и $\text{MIC}_{\text{MTS/RL}}$ индекс на фракционна инхибиторна концентрация (FICI) е 0,71 и потвърждава потенциращото действие на биосърфактанта (табл.1).

Получените резултати относно влиянието на MTS върху повърхностните клетъчни свойства на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 показаха повишаване на клетъчната пропускливост с нарастване на концентрацията на веществото. При ниска концентрация на MTS (10 $\mu\text{g/ml}$), както при самостоятелно приложение, така и в комплекс с RL, количеството извънклетъчен белтък е слабо повишено в сравнение с контролата. При по-високи концентрации на MTS и в присъствие на рамнолипид - биосърфактант количеството освободен белтък се увеличава до 59,5% спрямо контролните клетки и инхибиращото действие се засилва (фиг. 2б).



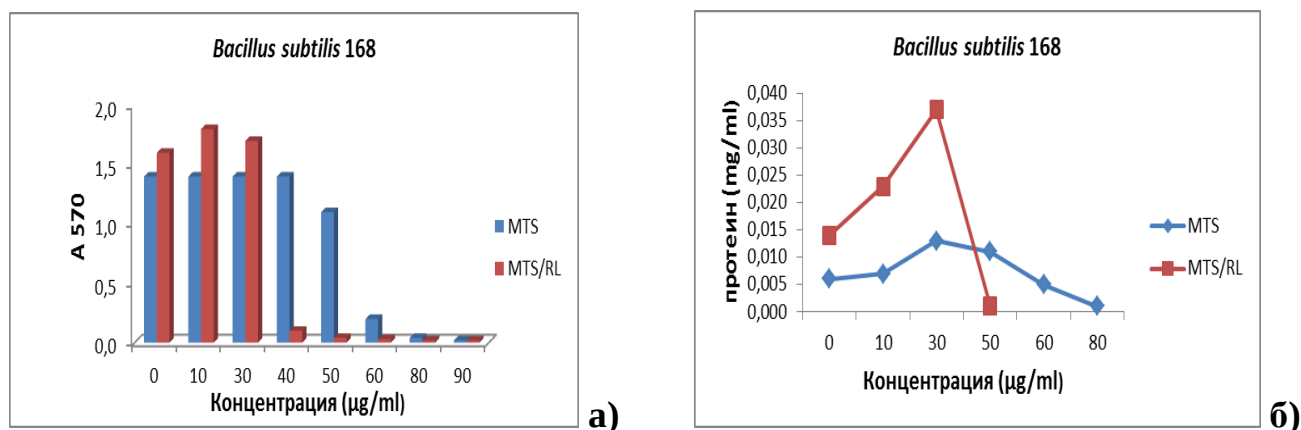
Фиг.2. Влияние на различни концентрации на MTS върху растежа (а) и екстрацелуларния белтък (б) на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 в отсъствие и в присъствие на RL

1.1.1.2. Влияние на MTS и неговия комплекс с RL (MTS/RL) върху растежа и пермеабилитета на *Bacillus subtilis* 168

В хода на изследването бяха отчетени по-ниска MIC (60 µg/ml) и по-висока MBC (90 µg/ml) при *Bacillus subtilis* 168 в сравнение с *Pseudomonas aeruginosa* 1390. Изпитаните концентрации до 80 µg/ml вероятно нямат спороциден ефект, на което се дължи и регистрираната висока стойност на MBC. Съотношението MBC/MIC е 1,5, което потвърждава, че капацитетът на MTS и при този щам е бактерициден (табл.1).

И при *Bacillus subtilis* 168, инхибиторът оказва по-силен ефект в присъствие на RL. Въпреки че в комбинация с по-ниски концентрации на MTS (до 30 µg/ml), рамнолипид – биосърфактантът има дори слабо стимулиращ ефект върху бактериалния растеж, комплексното действие на MTS/RL води до значително понижение в MIC (40 µg/ml) и особено в MBC (50 µg/ml) (фиг.3а). Отчетените CFU/ml свидетелстват за адитивното действие на рамнолипида. Приложен в концентрация 10 µg/ml RL не подтиска бактериалния растеж (CFU/ml 180×10^{10}) в сравнение с контролата (CFU/ml 200×10^{10}). При самостоятелно прилагане на MTS, концентрация 50 µg/ml не е летална (CFU/ml 140×10^{10}), докато при същата концентрация, но в присъствие на RL, CFU/ml драстично намаляват ($0,128 \times 10^{10}$). Стойността на FICI (= 0,67) доказва кумулативен ефект на веществата.

MTS съществено повлиява повърхностните клетъчни свойства на *Bacillus subtilis* 168. Експерименталните данни показват увеличаване на количеството екстрацелуларен белтък със 131% в сравнение с контролата при концентрация на антибактериалния агент 30 µg/ml. Освобождаването на повишени количества екстрацелуларен белтък в присъствие на RL е доказателство за значителни промени в пермеабилитета на клетката. В същата концентрация на MTS, но в присъствие на RL, нарастването в количеството извънклетъчен белтък достига до 157% (фиг.3б).



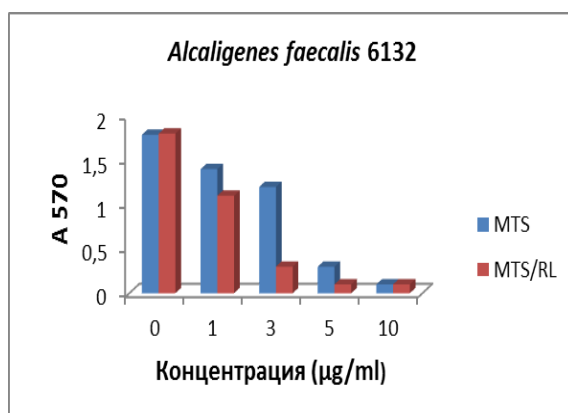
Фиг. 3. Влияние на различни концентрации на MTS върху растежа (а) и екстрацелуларния белтък (б) на *Bacillus subtilis* 168 в отсъствие и в присъствие на RL

1.1.1.3. Влияние на MTS и неговия комплекс с RL (MTS/RL) върху растежа на *Alcaligenes faecalis* 6132

Силно изразена чувствителност към MTS демонстрира *Alcaligenes faecalis* 6132. Инхибиране на растежа беше отчетено дори при най-ниската тествана концентрация - 1 µg/ml. MIC беше регистрирана при концентрация 5 µg/ml, а MBC - при 10 µg/ml. Съотношението MBC/MIC (= 2) е индикация за бактерициден потенциал на MTS при този щам (фиг.4, табл. 1).

Комбинацията MTS/RL понижава MIC до 3 µg/ml, а MBC - до 5 µg/ml съответно. И при този щам стойността на FICI (= 0,6) показва кумулативен ефект.

При *Alcaligenes faecalis* 6132 също беше отчетен пермеабилзиращ ефект и повишено количество екстрацелуларен белтък при третиране с комплекс MTS/RL.



Фиг. 4. Влияние на различни концентрации на MTS върху растежа на *Alcaligenes faecalis* 6132 в отсъствие и в присъствие на RL

1.1.1.4. Влияние на MTS и неговия комплекс с RL (MTS/RL) върху растежа на *Escherichia coli* W 1655 и *Escherichia coli* 25922

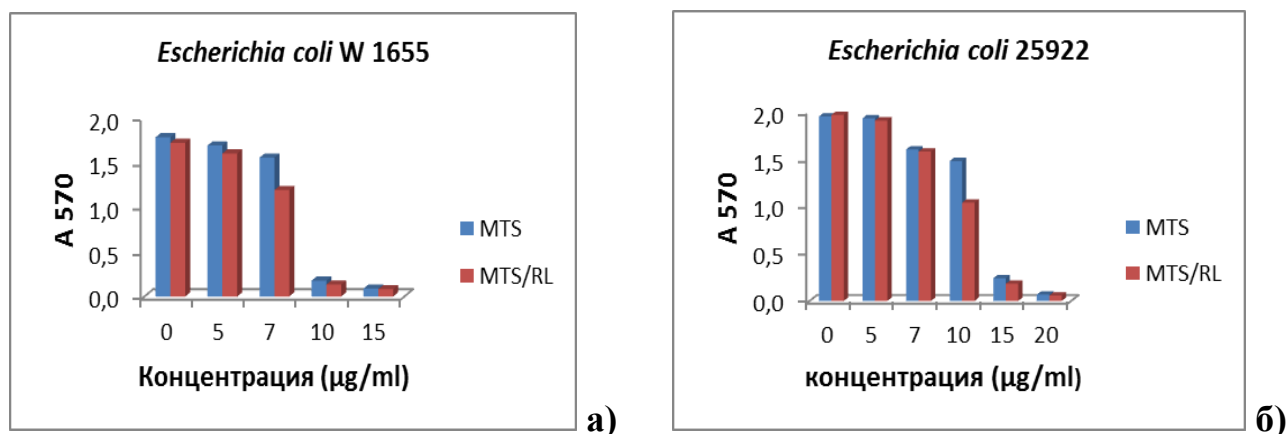
Проведените експерименти установиха добре изразен антимикробен ефект на MTS и при двата щама *Escherichia coli*. За разлика обаче от останалите тествани щамове, присъствието на RL не оказва влияние върху стойностите на MICs и MBCs.

MIC_{MTS} при *Escherichia coli* W 1655 беше регистрирана при 10 µg/ml. Въпреки че в сублетална концентрация (7 µg/ml) комплексът предизвиква видимо понижение в растежа в сравнение със самостоятелно приложения инхибитор, установената MIC_{MTS/RL} не е по-ниска от MIC_{MTS} и също е 10 µg/ml. Не беше отчетена разлика и по отношение на MBC (15 µg/ml) – независимо дали клетките са третирани само с MTS или в комбинация с RL (фиг. 5а).

При *Escherichia coli* 25922 бяха установени малко по-високи минимални инхибиращи концентрации отколкото при *Escherichia coli* W 1655 – съответно: MIC_{MTS} - 15 µg/ml и MBC_{MTS} – 20 µg/ml (фиг. 5б). Комплексът с RL и при този щам не оказва влияние върху MBC.

Съотношението MBC/MIC (1,5 при *Escherichia coli* W 1655 и 1,3 при *Escherichia coli* 25922) доказва бактерицидния капацитет на MTS и при двата щама. За разлика от останалите три моделни щама, при които съотношението $MBC/MIC_{MTS} > MBC/MIC_{MTS/RL}$ и удостоверява по-мощния антимикробен ефект на комбинацията, тук стойността се запазва непроменена, което показва, че рамнолипидът не усилва действието на инхибитора. Взаимодействието между двете вещества в този случай може да се охарактеризира като индиферентно, което се потвърждава и от FICI (= 1) (табл. 1).

Не се наблюдава разлика в количеството екстрацелуларен протеин в отсъствие и в присъствие на RL, което предполага липса на пермеабилизиращ ефект.



Фиг.5. Влияние на различни концентрации на MTS в отсъствие и в присъствие на RL върху растежа на: а) *Escherichia coli* W 1655 и б) *Escherichia coli* 25922

1.1.2. Етилтиосулфонат (ETS)

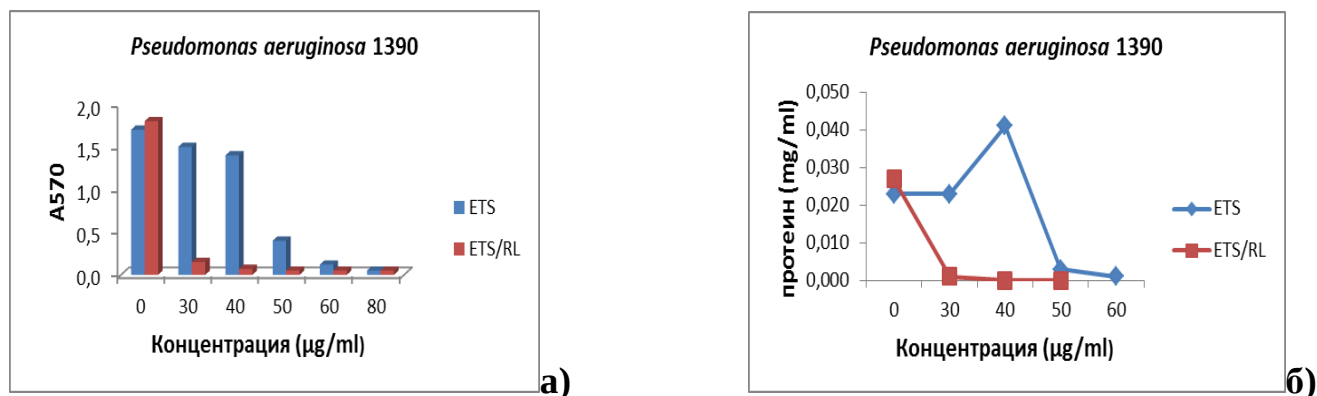
1.1.2.1. Влияние на ETS и неговия комплекс с RL (ETS/RL) върху растежа и пермеабилитета на *Pseudomonas aeruginosa* 1390

В хода на изследването се установи, че антибактериалното действие на ETS е по-слабо в сравнение с MTS. Отчетено е значително потискане на растежа - CFU/ml намаляват от $8,504 \times 10^8$ (контролна проба) до $1,414 \times 10^8$ при концентрация 50 µg/ml и до $0,212 \times 10^8$ при 60 µg/ml. Резултатите от проведените експерименти показаха, че MIC и MBC съвпадат (80 µg/ml) (фиг. 6а). Съотношението MBC/MIC (= 1) дава основание ETS да бъде оценен като вещество с бактерициден потенциал срещу *Pseudomonas aeruginosa* 1390 (табл.1).

В присъствие на RL, инхибиращото действие на ETS се проявява при значително по-ниски концентрации. В концентрация 30 µg/ml комплексът ETS/RL редуцира CFU/ml до $0,128 \times 10^8$ в сравнение с $7,964 \times 10^8$ при самостоятелно прилагане на тиосулфоната. MIC_{ETS/RL} и MBC_{ETS/RL} се понижават до 40 µg/ml. Стойността на FICI (= 0,5) е индикация за добре изразено синергично действие между ETS и рамнолипид – биосърфактанта.

По отношение влиянието на ETS върху повърхностните свойства на клетката, данните показват, че при концентрация 40 µg/ml изпитваното вещество

има силно изразен пермеабилзиращ ефект. Количеството на извънклетъчния белтък нараства двукратно (фиг. 6б).



Фиг. 6. Влияние на различни концентрации на ETS върху растежа (а) и екстрацелуларния белтък (б) на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 в отсъствие и в присъствие на RL

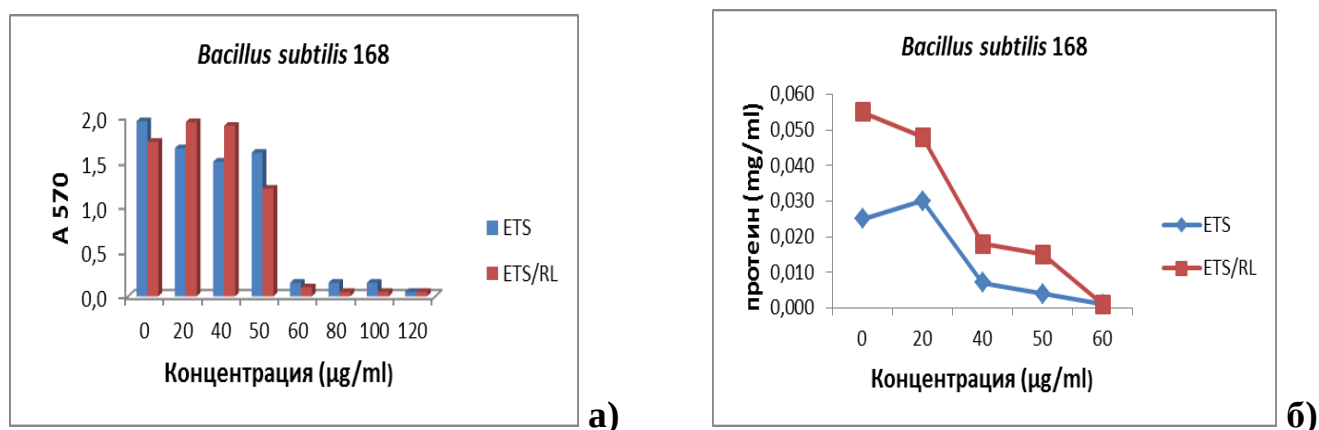
1.1.2.2. Влияние на ETS и неговия комплекс с RL (ETS/RL) върху растежа и пермеабилитета на *Bacillus subtilis* 168

Липса на микробен растеж при самостоятелно прилагане на ETS беше отчетена при 60 μg/ml, т.е. MIC_{ETS} съвпада с установената MIC_{MTS} (60 μg/ml). Бактерицидното действие на ETS, обаче, се проявява при значително по-висока концентрация в сравнение с MTS. В концентрация до 100 μg/ml действието на ETS е бактериостатично – растежът е инхибиран, но след посевка на пробите върху агар се отчитат формиращи колонии единици. MBC_{ETS} беше регистрирана при 120 μg/ml (фиг. 7а).

Според възприетия критерий за оценка на антимикробния потенциал на дадено вещество - съотношението MBC/MIC е 2, което позволява ETS да бъде оценен като бактерициден агент при *Bacillus subtilis* 168. В сравнение с MTS, вероятно спороцидното му действие е по-слабо изразено.

Комбинирането на ETS и RL не повлиява MIC_{ETS/RL} (60 μg/ml), но значително понижава стойността на MBC_{ETS/RL} (80 μg/ml). Съотношението MBC/MIC_{ETS/RL} (1,33) потвърждава засилване на бактерицидния потенциал на комплекса. FIC индексът (=1) дава основание действието на RL да бъде определено като потенциращо антибактериалната активност на ETS (табл. 1).

Получените данни относно въздействието на ETS върху повърхностните клетъчни свойства на *Bacillus subtilis* 168 разкриват значителна разлика в количеството екстрацелуларен белтък в присъствие и отсъствие на рамнолипида (фиг.7б). Биосърфактантът провокира промени в повърхностните клетъчни структури. Усиленият протеинов излив при въздействие на комплекса ETS/RL предполага повишен клетъчен пермеабилитет.



Фиг. 7. Влияние на различни концентрации на ETS върху растежа (а) и екстрацелуларния белтък (б) на *Bacillus subtilis* 168 в отсъствие и в присъствие на RL

1.1.2.3. Влияние на ETS и неговия комплекс с RL (ETS/RL) върху растежа на *Alcaligenes faecalis* 6132

Alcaligenes faecalis 6132 прояви силно изразена чувствителност и към втория тиосулфонат. Бяха получени идентични резултати с установените при MTS - MIC_{ETS} (5 µg/ml) и MBC_{ETS} (10µg/ml). Съотношението MBC/MIC_{ETS} (=2) потвърждава еднакъв бактерициден потенциал на двата тиосулфоната при *Alcaligenes faecalis* 6132.

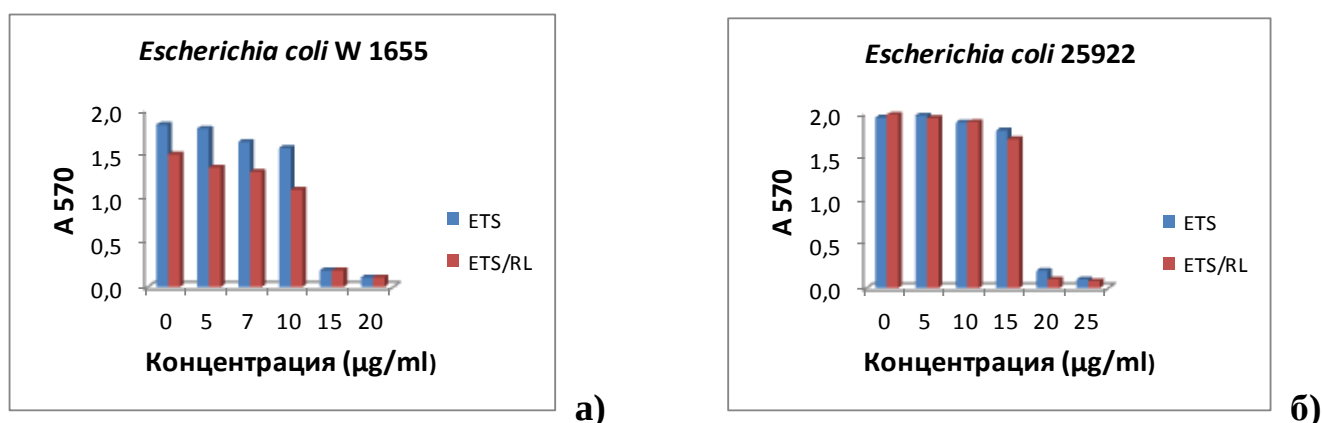
Съвместното прилагане на ETS и RL понижава MIC_{ETS/RL} до 2 µg/ml, а MBC_{ETS/RL} до 5µg/ml. FIC индексът (= 0,2) свидетелства за добре изразен синергичен ефект между двете вещества (табл. 1).

1.1.2.4. Влияние на ETS и неговия комплекс с RL (ETS/RL) върху растежа на *Escherichia coli* W 1655 и *Escherichia coli* 25922

Подобно на MTS, данните от проведените експерименти с ETS при двата щама *Escherichia coli* потвърдиха по-висока чувствителност на клиничния изолат в сравнение с референтния щам. Беше установена MIC 15 µg/ml при *Escherichia coli* W 1655 и 20 µg/ml при *Escherichia coli* 25922. Като MBCs бяха определени 20 µg/ml и 25 µg/ml съответно (фиг. 8а,б). И при двата щама съотношението MBC/MIC (1,3 и 1,25 респективно) е в границите, окачествяващи ETS като субстанция с бактерициден капацитет (табл.1). Установените по-високи MICs и MBCs в сравнение с MTS показват идентичен, но по-слаб антимикробен ефект на ETS.

Както и при MTS, присъствието на RL не оказва влияние върху инхибиторния ефект на ETS. Взаимодействието между веществата може да се определи като индиферентно.

Не се наблюдава съществена разлика в количеството екстрацелуларен протеин в отсъствие и в присъствие на RL.



Фиг.8. Влияние на различни концентрации на ETS в отсъствие и в присъствие на RL върху растежа на: а) *Escherichia coli* W 1655 и б) *Escherichia coli* 25922

Табл.1. MIC, MBC, бактерициден капацитет на синтетични тиосулфонил- производни и степен на взаимодействие с RL

Щам	MTS			MTS/ RL			FICI
	MIC µg/ml	MBC µg/ml	MBC/MIC	MIC µg/ml	MBC µg/ml	MBC/MIC	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1390	70	80	1,14	50	50	1	0,71
<i>Bacillus subtilis</i> 168	60	90	1,5	40	50	1,25	0,67
<i>Alcaligenes faecalis</i> 6132	5	10	2	3	5	1,67	0,6
<i>Escherichia coli</i> W 1655	10	15	1,5	10	15	1,5	1
<i>Escherichia coli</i> 25922	15	20	1,3	1,5	20	1,3	1
	ETS			ETS/ RL			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1390	80	80	1	40	40	1	0,5
<i>Bacillus subtilis</i> 168	60	120	2	60	80	1,33	1
<i>Alcaligenes faecalis</i> 6132	5	10	2	2	5	2,5	0,4
<i>Escherichia coli</i> W 1655	15	20	1,3	15	20	1,3	1
<i>Escherichia coli</i> 25922	20	25	1,25	20	25	1,25	1

1.2. Изследване влиянието на синтетични 1,4 – нафтохинон- производни

1.2.1. Lub 4

От трите изследвани 1,4 - нафтохинонови деривата, Lub 4 прояви най-ниска антимикробна активност. Инхибиране на растежа беше наблюдавано само при два от изследваните щамове - *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168. Действието на Lub 4 е бактериостатично и при двата щам. *Alcaligenes faecalis* 6132 и *Escherichia coli* W 1655 се оказаха резистентни към изследваното вещество.

Тъй като двата щам *Escherichia coli* показаха близки стойности на MIC и MBC на MTS и ETS, за следващите изследвания беше избран клиничния изолат - *Escherichia coli* W 1655.

1.2.1.1. Влияние на Lub 4 и неговия комплекс с RL (Lub 4/RL) върху растежа на *Pseudomonas aeruginosa* 1390

При концентрация 50 µg/ml беше регистрирано драстично намаляване в оптическата плътност на пробите (25% от OD на контролата). MIC беше установена при концентрация 60 µg/ml. Наличието на формиращи колонии единици след посевка на пробите, третирани с тази и по-високи концентрации, не позволи определяне на MBC на даденото вещество. Това даде основание да се предположи, че ефектът на Lub 4 е бактериостатичен при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 (фиг. 9a)

Експерименталните данни потвърдиха предположението за усилване на антибактериалното действие на инхибитора в комбинация с рамнолипид – биосърфактант. Комплексът Lub 4/RL значително понижи MIC до 30 µg/ml, но MBC не беше установена отново. FICI (= 0,5) потвърждава синергичния ефект между двете субстанции (табл. 2)

1.2.1.2. Влияние на Lub 4 и неговия комплекс с RL (Lub 4/RL) върху растежа на *Bacillus subtilis* 168

В сравнение с *Pseudomonas aeruginosa* 1390, антимикробният ефект на Lub 4 при *Bacillus subtilis* 168 е много по-слаб. Подтискане на растежа не се отчита дори при концентрация 100 µg/ml. MIC беше установената при 120 µg/ml.

Бактерицидно действие не беше регистрирано дори при концентрации, надвишаващи 120 µg/ml, което предполага слаб спороциден ефект на изследваното вещество.

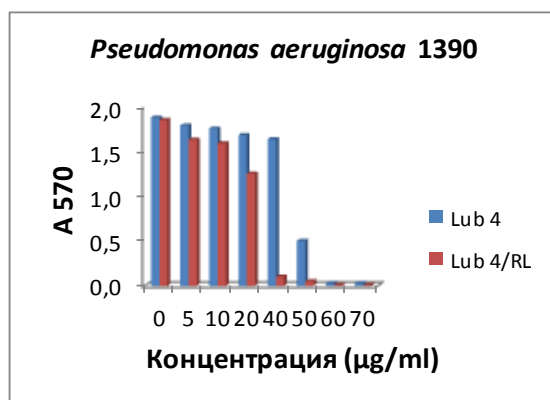
За разлика от самостоятелното прилагане на инхибитора, в присъствие на RL растежът драстично намалява дори при ниски концентрации на Lub 4 (до 70% при 10 µg/ml и до 90% при 30 µg/ml спрямо контролата). MIC на комплекса Lub 4/RL беше установена при 70 µg/ml. FICI (= 0,58) определя взаимодействието между двете вещества като адитивно (фиг. 9б; табл. 2).

1.2.1.3. Влияние на Lub 4 и неговия комплекс с RL (Lub 4/RL) върху растежа на *Alcaligenes faecalis* 6132

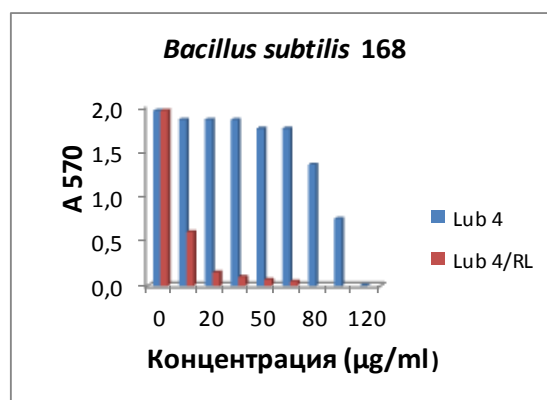
При самостоятелно прилагане на инхибитора, микробният растеж на *Alcaligenes faecalis* 6132 не се повлиява до концентрация 100 µg/ml. При същата концентрация на Lub 4 в комплекс с RL значително намалява оптичестката плътност (с 75 %), но пълно инхибиране на бактериалния растеж не се отчита и MIC не беше регистрирана (фиг. 9в; табл. 2).

1.2.1.4. Влияние на Lub 4 и неговия комплекс с RL (Lub 4/RL) върху растежа на *Escherichia coli* W 1655

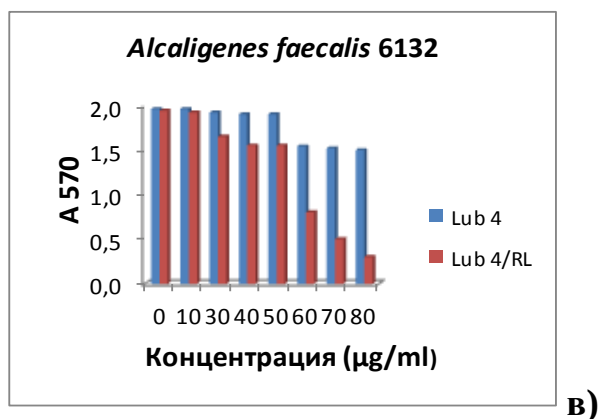
При прилагане на Lub 4 в концентрации до 120 µg/ml, както самостоятелно, така и в комбинация с RL, микробният растеж не се инхибира, което доказва пълна нечувствителност на *Escherichia coli* W 1655 към този антимикробен агент (табл.2).



а)



б)



Фиг.9. Влияние на различни концентрации на Lub 4 в отсъствие и в присъствие на RL върху растежа на: а) *Pseudomonas aeruginosa* 1390; б) *Bacillus subtilis* 168; в) *Alcaligenes faecalis* 6132

1.2.2. Lub 5

Въз основа на експерименталните данни беше констатирано, че Lub 5 се отличава с мощен антимикробен потенциал. Регистрираните MICs са значително по-ниски в сравнение с другите два 1,4 – нафтохинонови деривата. Нещо повече - за разлика от тях, никой от тестваните щамове не прояви резистентност към Lub 5. Въпреки че получените резултати доказаха добра антимикробна ефективност, Lub 5 има само бактериостатичен капацитет. Бактерицидна концентрация не се установи при никой от моделните щамове.

1.2.2.1. Влияние на Lub 5 и неговия комплекс с RL (Lub 5/RL) върху растежа на *Pseudomonas aeruginosa* 1390

Чувствително подтискане на микробния растеж при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 се отчита дори в най-ниските изпитвани концентрации на Lub 5. Оптическата плътност намалява със 70 % при концентрация 1 µg/ml, а над 2 µg/ml – с 90 %. Пълна липса на растеж се установи при 30 µg/ml (фиг. 10a). Бактерицидна концентрация не беше регистрирана.

Добавянето на рамнолипид значително подобри антибактериалната активност на Lub 5. Десетократно намаление в оптическата плътност на пробите, третирани с комплекс Lub 5/RL в сравнение с контролата, беше отбелязано дори при най-ниската тествана концентрация - 1 µg/ml. В присъствие на RL, MIC се

понижава до 10 µg/ml. Добре изразеният синергизъм между двете субстанции се потвърждава и от FICI (= 0,33) (табл.2).

1.2.2.2. Влияние на Lub 5 и неговия комплекс с RL (Lub 5/RL) върху растежа на *Bacillus subtilis* 168

Получените резултати доказаха наличието на силен антибактериален ефект на Lub 5 и при *Bacillus subtilis* 168. Инхибиторът предизвиква драстично понижение в микробния растеж в концентрация 5 µg/ml, който изчезва напълно при 10 µg/ml. Присъствието на RL сведе MIC до 2 µg/ml (фиг. 10б). И в този случай е налице синергично взаимодействие между инхибитора и рамнолипид - биосърфактанта, за което свидетелства и FICI (= 0,2) (табл.2).

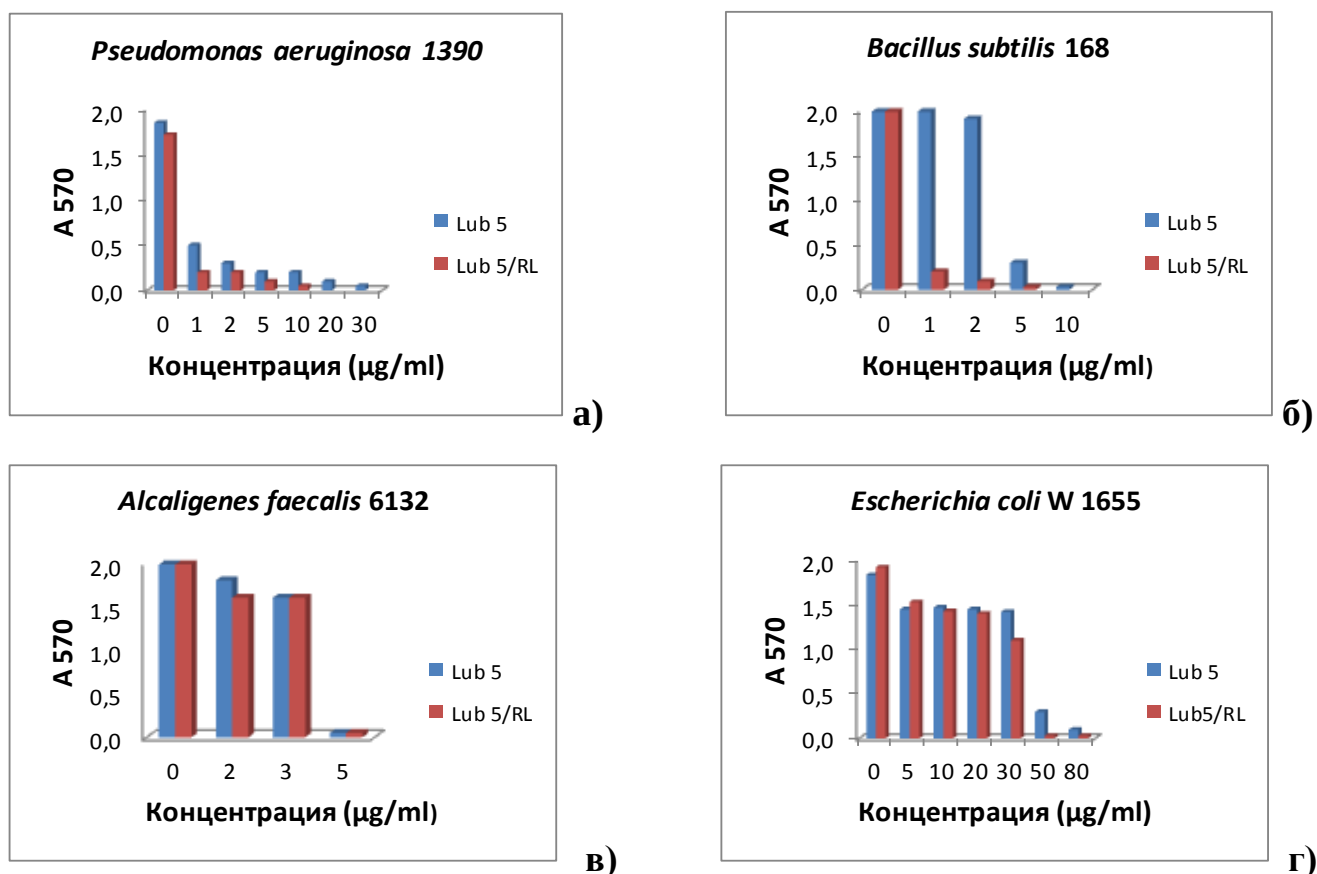
1.2.2.3. Влияние на Lub 5 и неговия комплекс с RL (Lub 5/RL) върху растежа на *Alcaligenes faecalis* 6132

Подобно на действието на двата изследвани тиосулфанилови естера, *Alcaligenes faecalis* 6132 се оказва най-чувствителен към Lub 5 в сравнение с останалите тествани щамове. MIC беше отчетена при 5 µg/ml. Добавянето на рамнолипида в този случай, обаче, не потенцира ефекта на антимикробния агент (MIC на комплекса Lub 5/RL също е 5 µg/ml) (фиг. 10в). Според FICI (=1) взаимодействието между двете субстанции може да се окачестви като индиферентно (табл. 2).

1.2.2.4. Влияние на Lub 5 и неговия комплекс с RL (Lub 5/RL) върху растежа на *Escherichia coli* W 1655

В сравнение с останалите три щамове, експерименталните данни разкриха значително по-слаба антимикробна активност на Lub 5 при *Escherichia coli* W 1655. Оптическата плътност на пробите, третирани с Lub 5 рязко намалява при концентрация 50 µg/ml, но MIC не се регистрира до 80 µg/ml (фиг. 10г).

Добър адитивен ефект беше установен при прилагане на комплекса – MIC се понижава до 50 µg/ml. Той се потвърждава и от FICI (=0,6) (табл.2).



Фиг.10. Влияние на различни концентрации на Lub 5 в отсъствие и в присъствие на RL върху растежа на: а) *Pseudomonas aeruginosa* 1390; б) *Bacillus subtilis* 168; в) *Alcaligenes faecalis* 6132; г) *Escherichia coli* W 1655

1.2.3. Lub 6

Антибактериалният потенциал на Lub 6 беше изследван в концентрации до 120 µg/ml. Аналогично на Lub 4, анализът на получените данни разкри бактериостатичен ефект при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168, докато при *Alcaligenes faecalis* 6132 и *Escherichia coli* W 1655 резултатите не са категорични. Бактерицидна концентрация не беше установена при никой от проучваните щамове.

1.2.3.1. Влияние на Lub 6 и неговия комплекс с RL (Lub 6/RL) върху растежа на *Pseudomonas aeruginosa* 1390

Проучванията върху антибактериалната активност на трите 1,4 – нафтохинонови деривата показва сходен ефект на Lub 4 и Lub 6 при *Pseudomonas*

aeruginosa 1390. Микробният растеж значително намалява при концентрация на Lub 6 60 µg/ml. MIC беше регистрирана при 70 µg/ml.

Разликата в действието на Lub 6 самостоятелно и в комбинация с RL е ясно забележима дори при ниски концентрации. Оптическата плътност на третираните с комплекса проби силно намалява - с 50 % при концентрация 5 µg/ml и с 80 % - при 10 µg/ml. Рамнолипидът понижава MIC до 50 µg/ml (фиг. 11а). Въз основа на FICI (= 0,71) взаимодействието между Lub 6 и RL може да се счита за потенциращо (табл. 2).

1.2.3.2. Влияние на Lub 6 и неговия комплекс с RL (Lub 6/RL) върху растежа на *Bacillus subtilis* 168

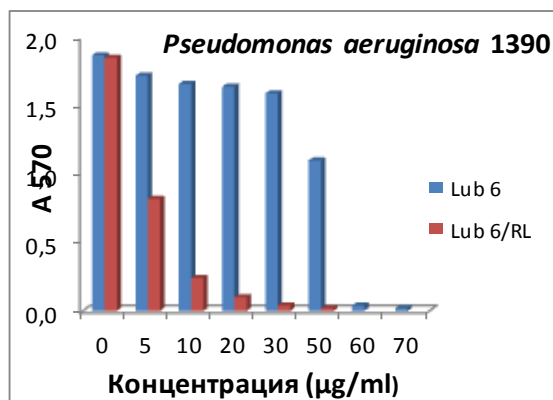
В концентрация до 50 µg/ml, Lub 6 няма инхибиращ ефект при *Bacillus subtilis* 168. Увеличението на концентрацията на 70 µg/ml предизвика отчетливо подтискане на микробния растеж, но пълно инхибиране беше отчетено при концентрация 80 µg/ml (фиг. 11б). Оптическата плътност на пробите, третирани с Lub 6 в комбинация с RL е неколkokратно намалена в сравнение с тази при самостоятелното му приложение в същите концентрации. MIC на комплекса Lub 6/RL се понижава до 30 µg/ml. FICI (= 0,37) потвърждава синергичното взаимодействие между двете вещества (табл. 2).

1.2.3.3. Влияние на Lub 6 и неговия комплекс с RL (Lub 6/RL) върху растежа на *Alcaligenes faecalis* 6132

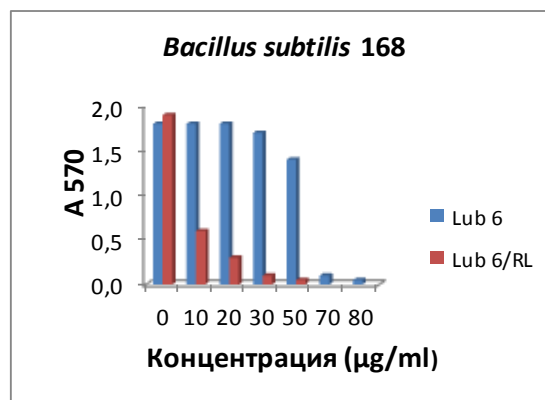
Пълно инхибиране на микробния растеж при *Alcaligenes faecalis* 6132 не беше отбелязано при самостоятелно прилагане на Lub 6. Микробният растеж остава неповлиян до концентрация 50 µg/ml (фиг. 11в). В концентрация 70 µg/ml инхибиторът предизвиква значително подтискане, но следи от слаб растеж се регистрират и при по-високи концентрации, включително надхвърлящи 100 µg/ml, което не позволи определяне на MIC. Същевременно, комбинацията с рамнолипид демонстрира силна ефективност. MIC на комплекса Lub 6/RL беше установена при 30 µg/ml. Взаимодействието между двете вещества е синергично (FICI (= 0,3) (табл.2).

1.2.3.4. Влияние на Lub 6 и неговия комплекс с RL (Lub 6/RL) върху растежа на *Escherichia coli* W 1655

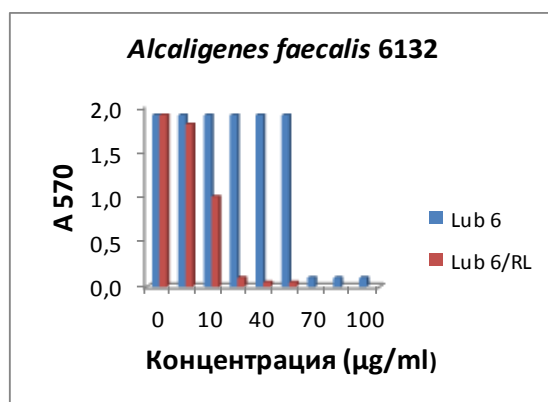
Аналогично на действието на Lub 4, получените резултати не дадоха индикация за инхибиращ ефект на Lub 6 при *Escherichia coli* W 1655. Бактериалният растеж остава непроменен в целия тестван концентрационен диапазон на инхибитора. Щамът прояви резистентност също и към комплекса Lub 6/RL. Добавянето на рамнолипид не повлиява инхибиторната активност на Lub 6.



а)



б)



в)

Фиг.11. Влияние на различни концентрации на Lub 6 в отсъствие и в присъствие на RL върху растежа на: а) *Pseudomonas aeruginosa* 1390; б) *Bacillus subtilis* 168; в) *Alcaligenes faecalis* 6132

Табл. 2. MIC на синтетични 1,4-нафтохинонови производни и степен на взаимодействие с RL

Щам	MIC µg/ml	Lub 4	MIC µg/ml	Lub 4/RL	FICI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1390	60		30		0,5
<i>Bacillus subtilis</i> 168	120		70		0,58
<i>Alcaligenes faecalis</i> 6132	резистентен		резистентен		
<i>Escherichia coli</i> W 1655	резистентен		резистентен		
	MIC µg/ml	Lub 5	MIC µg/ml	Lub 5/RL	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1390	30		10		0,33
<i>Bacillus subtilis</i> 168	10		2		0,2
<i>Alcaligenes faecalis</i> 6132	5		5		1
<i>Escherichia coli</i> W 1655	резистентен		резистентен		
	MIC µg/ml	Lub 6	MIC µg/ml	Lub 6/RL	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1390	70		50		0,71
<i>Bacillus subtilis</i> 168	80		30		0,37
<i>Alcaligenes faecalis</i> 6132	100		30		0,3
<i>Escherichia coli</i> W 1655	резистентен		резистентен		

2. Проучване на комбиниран ефект на синтетични тиосулфонил- и 1,4-нафтохинон- производни

След като беше проучен антимикробният потенциал на синтетичните тиосулфонил- и 1,4- нафтохинон- производни, бяха проведени експерименти в търсене на възможно синергично взаимодействие между двете групи инхибитори. За целта бяха подбрани по две сублетални концентрации на MTS и Lub 5 (в зависимост от установените MICs за даденото вещество при всеки щам), и комбинациите от тях бяха тествани при *Pseudomonas aeruginosa* 1390, *Escherichia coli* W 1655 и *Bacillus subtilis* 168. Резултатите са представени според отчетените CFU/ml $\times 10^7$ за всяка проба.

Комбинациите на двата инхибитора при *Bacillus subtilis* 168 бяха тествани в следните концентрации: а) 30 $\mu\text{g/ml}$ MTS/2 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5; б) 30 $\mu\text{g/ml}$ MTS/5 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5; в) 50 $\mu\text{g/ml}$ MTS/2 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5; г) 50 $\mu\text{g/ml}$ MTS/5 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5. Експерименталните данни не показаха разлика между самостоятелното и едновременното прилагане на MTS и Lub 5 в същите концентрации (Фиг. 12а).

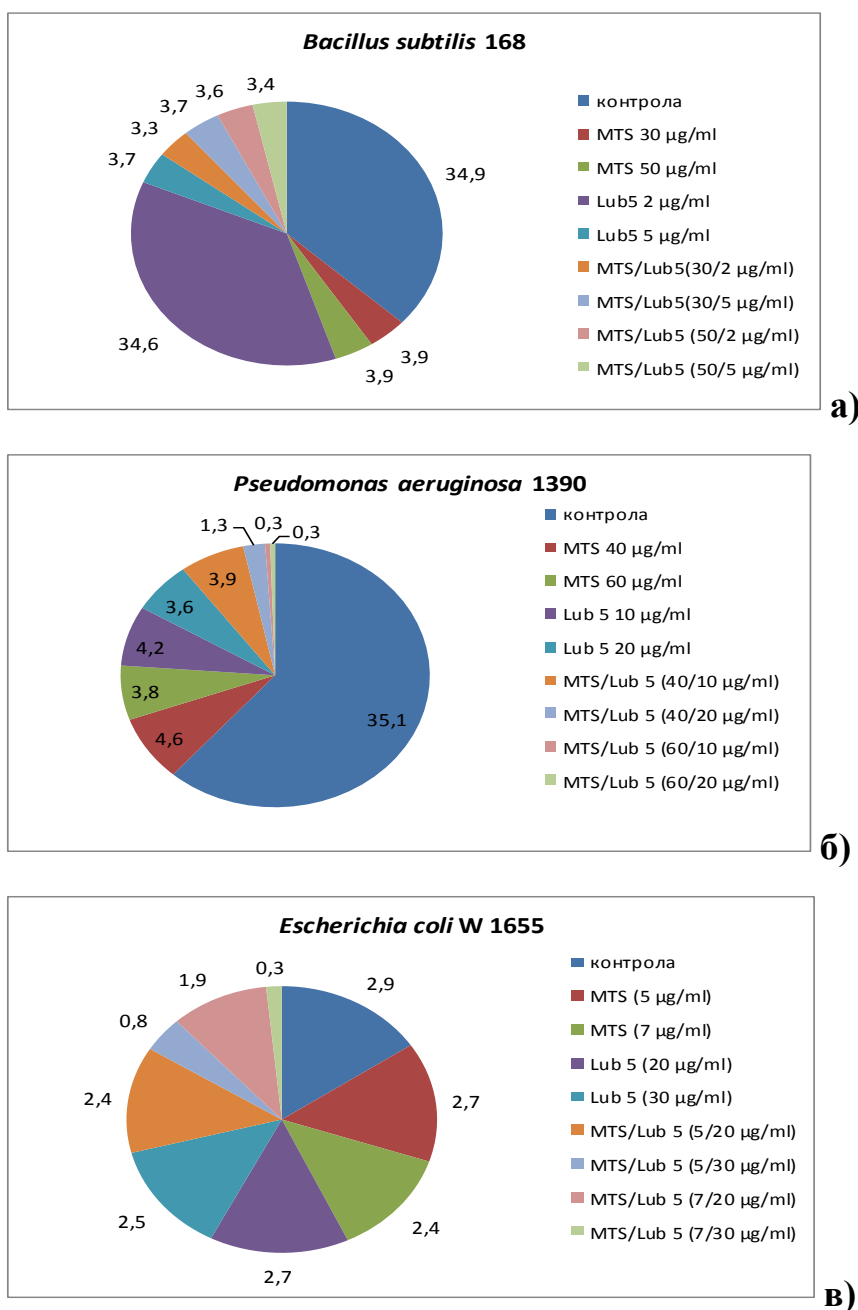
И при двата Грам (-) щама обаче комбинирането на по-високите подбрани концентрации на двата инхибитора води до значително инхибиране на растежа.

При *Pseudomonas aeruginosa* 1390 бяха подбрани концентрации на MTS 40 и 60 $\mu\text{g/ml}$, а на Lub 5 – 10 и 20 $\mu\text{g/ml}$ и на тази база бяха формирани 4 комбинации: 1) 40 $\mu\text{g/ml}$ MTS/10 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5; 2) 40 $\mu\text{g/ml}$ MTS/20 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5; 3) 60 $\mu\text{g/ml}$ MTS/10 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5; 4) 60 $\mu\text{g/ml}$ MTS/20 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5. Както се вижда от фиг. 12б, двата инхибитора, приложени самостоятелно в посочените концентрации имат сходен ефект (CFU/ml $3,8 \times 10^7$). Комбинацията от подбраните по-ниски концентрации на двете вещества (1) не показва различно инхибиторно действие в сравнение със самостоятелното им прилагане. Отчетеното намаляване в CFU/ml ($0,3 \times 10^7$) на пробите, третирани с комбинации (2), (3) и (4) предполага добре изразен синергичен ефект между изследваните синтетични деривати.

При *Escherichia coli* W 1655 бяха изследвани следните комбинации на концентрации: 1) 5 $\mu\text{g/ml}$ MTS/20 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5; 2) 5 $\mu\text{g/ml}$ MTS/30 $\mu\text{g/ml}$ Lub 5; 3) 7

$\mu\text{g/ml}$ MTS/ $20 \mu\text{g/ml}$ Lub 5; 4) $7 \mu\text{g/ml}$ MTS/ $30 \mu\text{g/ml}$ Lub 5. От фиг.12в е видно, че CFU/ml на пробите, третирани поотделно с веществата не се отличават от CFU/ml в контролната проба ($2,9 \times 10^7$). Резултатът от прилагане на комбинацията от подобраните по-ниски концентрации на двете вещества се оказа аналогичен на (1) при *Pseudomonas aeruginosa* 1390. При пробите, третирани с останалите комбинации, ефектът е синергичен.

Фиг.12. Комбиниран ефект на MTS и Lub 5 (CFU/ml $\times 10^7$) при: а) *Bacillus subtilis* 168; б) *Pseudomonas aeruginosa* 1390; в) *Escherichia coli* W 1655



В сравнение с двата Грам (-) щама, MIC на Lub 5 при *Bacillus subtilis* 168 е по-ниска. Същевременно способността на този микроорганизъм за спорообразуване вероятно е причина за отчетената значително по-висока MBC на MTS. Получените резултати не показаха индикация за синергично действие на двата инхибитора при този щам. Липсата на подобен ефект предполага по-слабо спороцидно действие.

3. Оценка на чувствителността на тестваните щамове към антибиотици

С оглед по-пълно изясняване на антимикробния потенциал на изследваните синтетични аналози беше отчетена чувствителността на тестваните моделни щамове към често използвани антибиотици. За целта бяха подбрани 5 антибиотика с различен механизъм на действие – ципрофлоксацин, цефтазидим, тобрамицин, меропенем и колистин. Резултатите са представени на фиг. 13 и 14, и на табл. 3.

В сравнение с конвенционалните антибиотици, природните продукти имат значително по-високи MICs и MBCs (Abreu *et al.*, 2013; Reiter *et al.*, 2017). Съпоставката на получените резултати потвърди очакванията, че установените MICs и MBCs на изследваните синтетични аналози при даден щам са значително по-високи в сравнение с MICs на тестваните антибиотици.

Според получените чрез AST резултати, най-силен ефект има ципрофлоксацинът. Отчетената MIC_{CIP} е най-ниска при 3 от проучваните щамове (*Bacillus subtilis* 168, *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Escherichia coli* W 1655) и равна на MIC_{MRP} при другите два щама (*Alcaligenes faecalis* 6132 и *Escherichia coli* 25922) (фиг. 13a).

Чувствителност към цефтазидим беше отчетена само при двата щама *Escherichia coli*. CAZ е един от малкото цефалоспорини, които имат активност срещу *Pseudomonas aeruginosa* и е от най-често предписваните антибиотици при инфекции, за които е доказано или се предполага, че са причинени от този патоген ([https:// www.who.int/ selection_medicines/ committees/ subcommittee /2/ Ceftazidime.pdf](https://www.who.int/selection_medicines/committees/subcommittee/2/Ceftazidime.pdf)). Същевременно според някои изследвания до 35% от клиничните

изолати *Pseudomonas aeruginosa* са придобили резистентност към този антибиотик, като една от най-честите посочени причини за това е свръхекспресия на OprM ефлуксните помпи (Du *et al.*, 2010). Тестваният моделен щам *Pseudomonas aeruginosa* 1390 също показва нечувствителност към цефтазидим.

От подобраните 5 антибиотика най-слаб инхибиращ ефект беше отчетен при колистина. При всички проучвани Грам (-) щамове, регистрираните MIC_{CS} са по-високи от MICs на останалите антибиотици. Получените резултати потвърдиха предвиждането, че *Bacillus subtilis* 168 е нечувствителен към колистин.

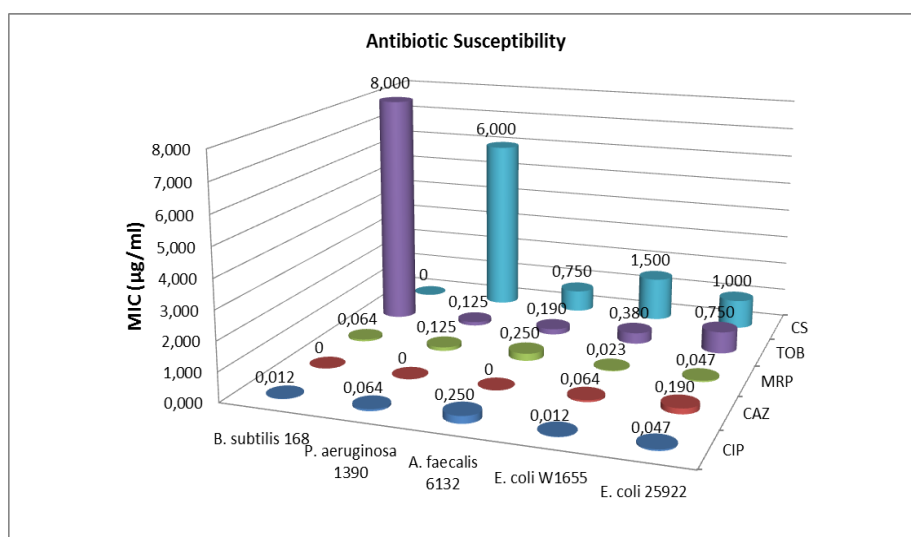
Bacillus subtilis 168 показва сензитивност към 3 от антибиотиците (фиг. 14б). Най-ниска MIC беше отчетена при ципрофлоксацин. Освен това, регистрираната MIC_{CIP} е по-ниска в сравнение с останалите щамове (фиг. 13). Като Грам (+) микроорганизъм, чувствителността на *Bacillus subtilis* 168 към тобрамицин е по-слаба отколкото на Грам (-) щамове. Интересно е да се отбележи, че регистрираната MIC_{TOB} (8 µg/ml) е близка до установената при него MIC на Lub 5 (10 µg/ml) и по-висока от MIC на комбинацията Lub 5/RL (2 µg/ml) (табл.3)

При *Pseudomonas aeruginosa* 1390 бяха отчетени еднакви MICs за тобрамицин и меропенем (0,125 µg/ml) (фиг. 14а), като MIC_{TOB} е най-ниска в сравнение с другите щамове, а по отношение на меропенем - по-висока MIC_{MRP} е регистрирана само при *Alcaligenes faecalis* 6132. Чувствителността на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 към колистин е значително по-слаба (6 µg/ml) отколкото при останалите Грам (-) щамове (фиг. 13).

Alcaligenes faecalis 6132 показва значително по-голяма устойчивост на ципрофлоксацин и меропенем от останалите моделни щамове (MIC_{CIP} и MIC_{MRP} – 0,25 µg/ml) (фиг. 14в). Трябва да се отбележи, че въпреки по-слабата чувствителност към тези антибиотици, той е по-уязвим към тиосулфаниловите естери и Lub 5. Както при останалите щамове, колистинът е с най-висока MIC (0,75 µg/ml) от всички тествани антибиотици (фиг.13). Същевременно регистрираната MIC_{CS} е по-ниска отколкото при другите Грам (-) щамове. MIC_{CS}

при *Alcaligenes faecalis* 6132 е най-близка до установената MIC на комплекса ETS/RL при този щам ($MIC_{ETS/RL} = 1 \mu\text{g/ml}$) (табл.3).

MIC Stripe – тестът свидетелства за относително по-висока устойчивост на референтния щам *Escherichia coli* 25922 в сравнение с клиничния изолат (фиг. 14г, д). Отчетените MICs на всички тествани антибиотици с изключение на колистин (при който са равни) са по-ниски при *Escherichia coli* W 1655. Освен чувствителност към цефтазидим, MIC_{CIP} и MIC_{MRP} на двата щам *Escherichia coli* са по-ниски отколкото при другите Грам (-) бактерии. Същевременно ефектът на тобрамицин е по-слаб, особено при *Escherichia coli* 25922.



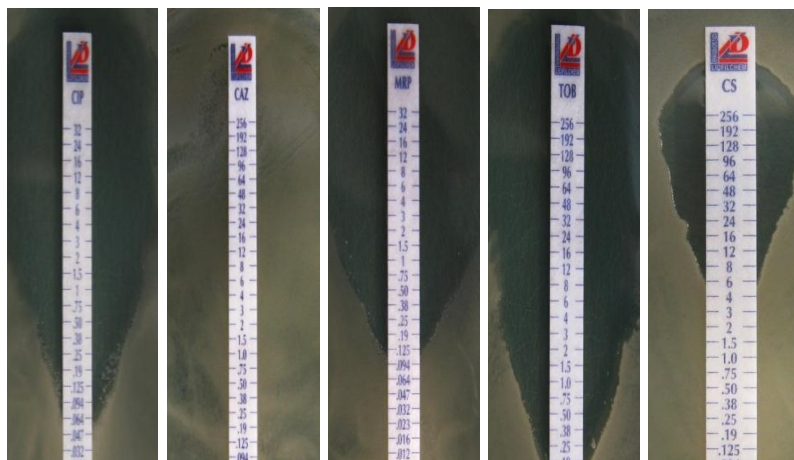
Фиг. 13. Чувствителност на моделните щамове към антибиотици

Табл. 3 Съпоставка между MICs ($\mu\text{g/ml}$) на изследваните тиосулфанил- и 1,4-нафтохинон производни (в отсъствие и присъствие на рамнолипид-биосърфактант) и MICs на някои конвенционални антибиотици при моделните щамове

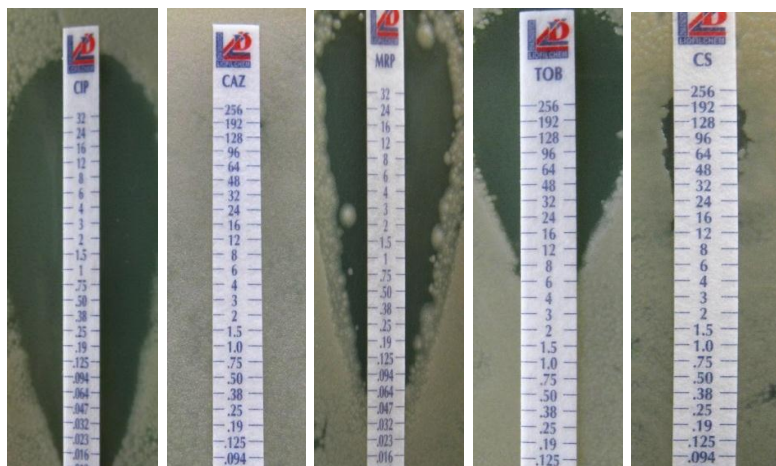
	MTS	MTS/RL	ETS	ETS/RL	Lub4	Lub4/RL	Lub5	Lub5/RL	Lub6	Lub6/RL	CIP	CAZ	MRP	TOB	CS
<i>Bacillus subtilis</i> 168	60	40	60	60	120	70	10	2	80	30	0,012	nd	0,064	8	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1390	70	50	80	40	60	30	30	10	70	50	0,064	nd	0,125	0,125	6
<i>Alcaligenes faecalis</i> 6132	5	3	5	1	nd	nd	5	5	100	30	0,25	nd	0,25	0,19	0,75
<i>Escherichia coli</i> W 1655	10	10	15	15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,012	0,064	0,023	0,38	1,5
<i>Escherichia coli</i> 25922	15	10	15	15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,047	0,19	0,047	0,75	1

0,012-0,064 $\mu\text{g/ml}$	0,125-0,75 $\mu\text{g/ml}$	1-10 $\mu\text{g/ml}$	15-20 $\mu\text{g/ml}$	30-50 $\mu\text{g/ml}$	60-80 $\mu\text{g/ml}$	100-120 $\mu\text{g/ml}$
------------------------------	-----------------------------	-----------------------	------------------------	------------------------	------------------------	--------------------------

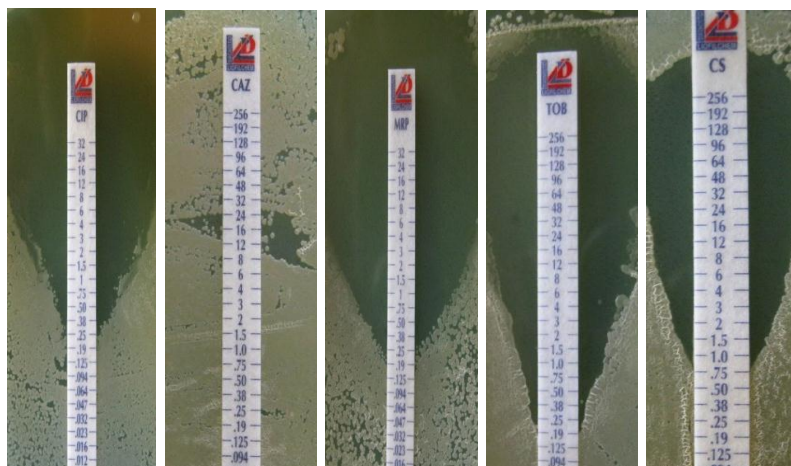
Фиг.14 . MIC – Strip тестове (Liofilchem®) за ципрофлоксацин (CIP), цефтазидим (CAZ), меропенем (MRP), тобрамицин (TOB) и колистин (CS) при моделните щамове



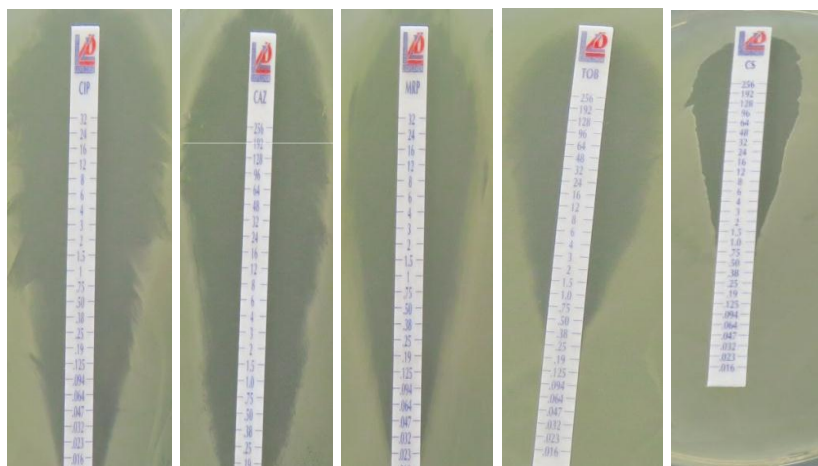
а) *Pseudomonas aeruginosa* 1390



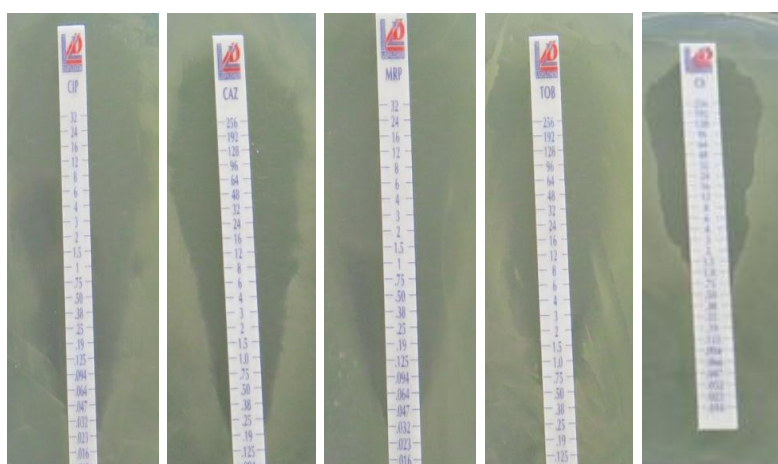
б) *Bacillus subtilis* 168



в) *Alcaligenes faecalis* 6132



г) *Escherichia coli* W 1655



д) *Escherichia coli* 25922

4. Проучване на цитотоксичния ефект на синтетични тиосулфонил- и 1,4-нафтохинон- производни върху клетъчни линии

Цитотоксичният ефект на изследваните алкил-естери на тиосулфаниловата киселина и 1,4- нафтохинонови производни е оценен при две клетъчни линии. Проследено е въздействието им върху Vero (нормални) и HEp-2 (ракови) клетки при експозиция на различни концентрации в диапазон, съответстващ на установените при тестваните щамове MICs. Проучен е също така и цитотоксичния ефект на комбинацията инхибитор/биосърфактант.

За определяне на цитотоксичното действие на проучваните антимикробни агенти е използван колориметричен метод с оцветяване на жизнените клетки с МТТ по модифицираната методика на Mosmann (1983).

Проведените експерименти показаха, че рамнолипид – биосърфактантът PS-17 в използваната концентрация (10 µg/ml) няма цитотоксично действие при двете клетъчни линии.

4.1. Оценка на цитотоксичния ефект на синтетични естери на тиосулфаниловата киселина (MTS и ETS)

Цитотоксичното действие на двата синтетични тиосулфоната е оценено при концентрации до 80 µg/ml.

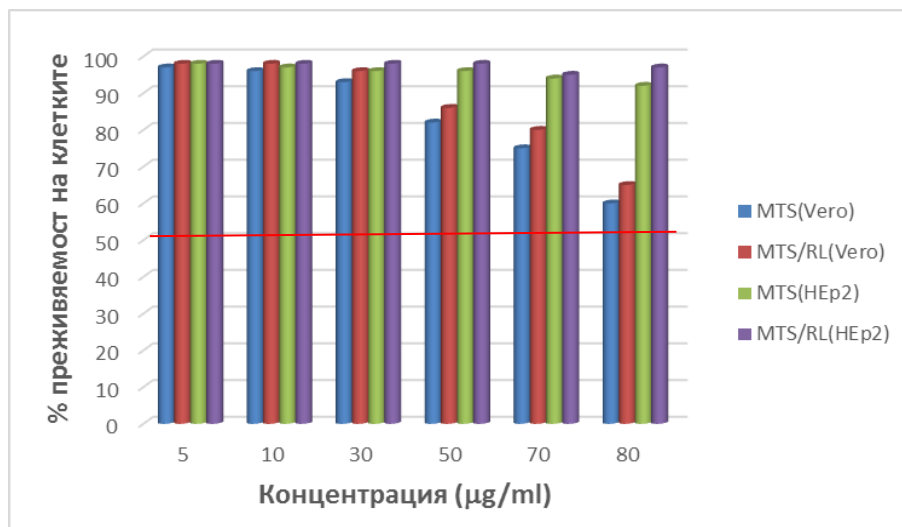
4.1.1. Оценка на цитотоксичния ефект на MTS

Получените резултати показаха, че MTS в концентрация до 80 µg/ml не оказва цитотоксично действие и при двете клетъчни линии. В целия тестван концентрационен диапазон, процентът жизнеспособни клетки надхвърля 50, което е възприето да се счита за праг на цитотоксичност. При Vero клетките с увеличаване на концентрацията до 70 µg/ml, преживяемостта се запазва над 75%, след което плавно намалява, достигайки до 60% при 80 µg/ml. В присъствие на RL, процентът на запазилите жизнеспособност клетки е с около 5% по-висок спрямо този при същата концентрация на инхибитора, приложен самостоятелно (фиг. 15).

Чувствителността на HEp2 клетките е още по-слаба. Отчетената преживяемост е над 92 % при най-високата тествана концентрация на инхибитора, а при комбинация с RL – над 98% (фиг. 15).

Съпоставянето на тези резултати за цитотоксично действие на MTS с установените MICs при различните щамове дава основание да се приеме, че в концентрациите, в които инхибиторът проявява бактерициден ефект, той не е цитотоксичен за нормални еукариотни клетки. При *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168 MIC и MBC на комплекса MTS/RL се понижава до 50 µg/ml. При тази концентрация Vero клетките запазват над 80% преживяемост (и почти 90% в присъствие на RL). Това потвърждава благоприятния ефект от добавянето на рамнолипида. Освен понижение в минималните инхибиращи и минималните бактерицидни концентрации, той допринася за смекчаване на цитотоксичния

ефект на инхибиторите. Съхраняването на висок процент жизнеспособни клетки при третиране с MTS в концентрация, в която е доказано неговото бактерицидно действие (особено съвместно с RL), разкрива обнадеждаващ потенциал за приложение с терапевтична цел.

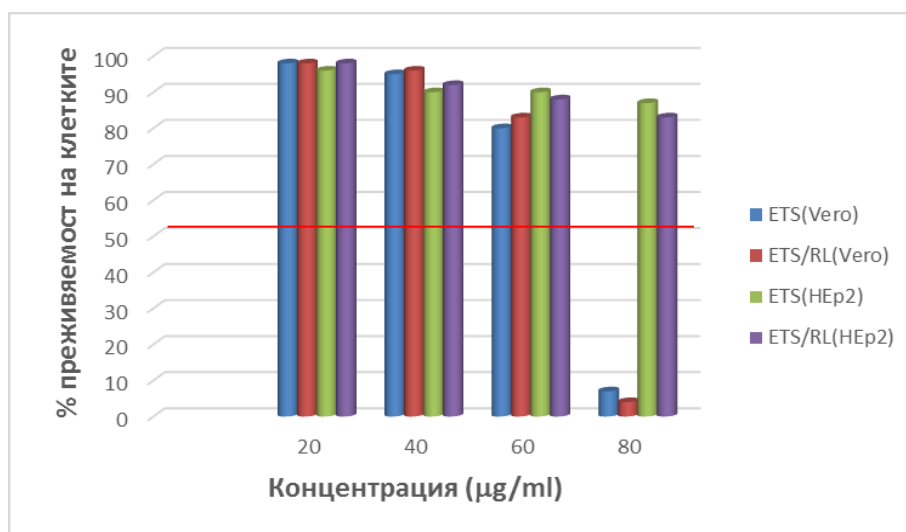


Фиг. 15. Цитотоксичен ефект на MTS

4.1.2. Оценка на цитотоксичния ефект на ETS

Преживяемостта на Vero клетките остава незасегната до концентрация на инхибитора 60 µg/ml, но с увеличение на 80 µg/ml рязко спада под 50%. ETS не оказва цитотоксично действие върху туморната клетъчна линия. Процентът жизнеспособни HEp2 клетки е незначително по-нисък отколкото при нормалните клетки, но се запазва над 80 % в целия тестван концентрационен диапазон (фиг. 16).

За разлика от въздействието при MTS, присъствието на RL не се отразява върху преживяемостта на двата вида клетки в сравнение със самостоятелното приложение на инхибитора. ETS има по-слаб антимикробен ефект от MTS. Регистрираните MICs и MBCs при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168 са по-високи и надхвърлят безвредната концентрация. Комплексът ETS/RL значително понижава MICs и при двата щама като установените стойности са по-ниски от прага на цитотоксичност (съответно 40 и 60 µg/ml).



Фиг. 16. Цитотоксичен ефект на ETS

Получените резултати относно цитотоксичния ефект на изследваните синтетични тиосулфонилови естери дават основание да се счита, че те се характеризират с относителна ниска цитотоксичност. Задоволителната степен на безвредност, съчетана с добър антимикробен потенциал, въпреки че не беше установена селективност спрямо туморната клетъчната линия, разкриват перспектива за приложимост на двата тиосулфоната в областта на биомедицината.

4.2. Оценка на цитотоксичния ефект на синтетични 1,4-нафтохинонови деривати

4.2.1. Оценка на цитотоксичния ефект на Lub 4

Концентрационният диапазон, в който е проследено въздействието на Lub 4 върху преживяемостта на двете клетъчни линии е определен от най-ниската и най-високата MICs, установени при различните щамове и обхваща концентрации от 30 до 120 µg/ml (табл. 2).

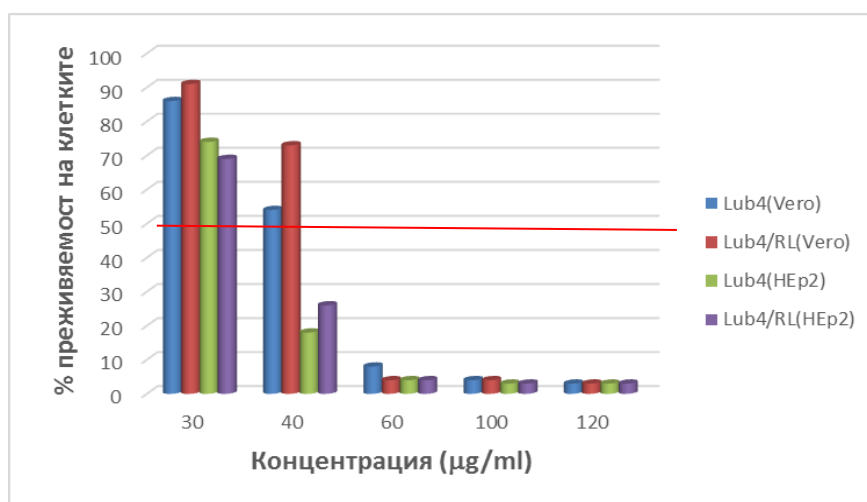
При нормалната клетъчна линия, в концентрация 30 µg/ml Lub 4 не оказва цитотоксичен ефект (86 % жизнеспособни клетки). Повишението на концентрацията на 40 µg/ml води до забележим спад в преживяемостта на Vero клетките - почти до прага на цитотоксичност (54%). Концентрация 60 µg/ml е силно токсична и се отчита пренебрежимо нисък процент оцелели клетки (фиг. 17). Това показва, че самостоятелно приложен, Lub 4 упражнява ефикасно

антимикробно действие в концентрации, значително надхвърлящи допустимото ниво на безвредност (установените MICs при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168 са 60 µg/ml и 120 µg/ml съответно).

От друга страна, комплексът Lub 4/RL понижава MIC при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 до 30 µg/ml. Нещо повече, експериментите разкриха, че комбинирането с биосърфактанта чувствително смекчава цитотоксичния ефект на Lub 4. При концентрация на инхибитора 30 µg/ml в присъствие на RL, жизнеспособните Vero клетки са над 90%. Значително по-висока е клетъчната преживяемост при добавяне на RL при концентрация на Lub 4 40 µg/ml (75%) в сравнение със самостоятелното действие на инхибитора (54%).

Интерес буди факта, че Lub 4 проявява добре изразена селективност спрямо туморната клетъчна линия. Концентрация на инхибитора 30 µg/ml не е цитотоксична за HEp2 клетките (74%), но жизнеспособността им е засегната по-силно отколкото на нормалните клетки (86%). В концентрация 40 µg/ml Lub 4 предизвиква осезаем цитотоксичен ефект при туморните клетки (18%), докато процентът оцелели Vero клетки надвишава прага на безвредност (54%).

Силната цитотоксичност на Lub 4, съчетана с незадоволителна антимикробна активност, би била лимитиращ фактор за фармацевтична употреба. Потенциално приложение на този 1,4-нафтохинов дериват би могло да се търси евентуално в противотуморни терапии.

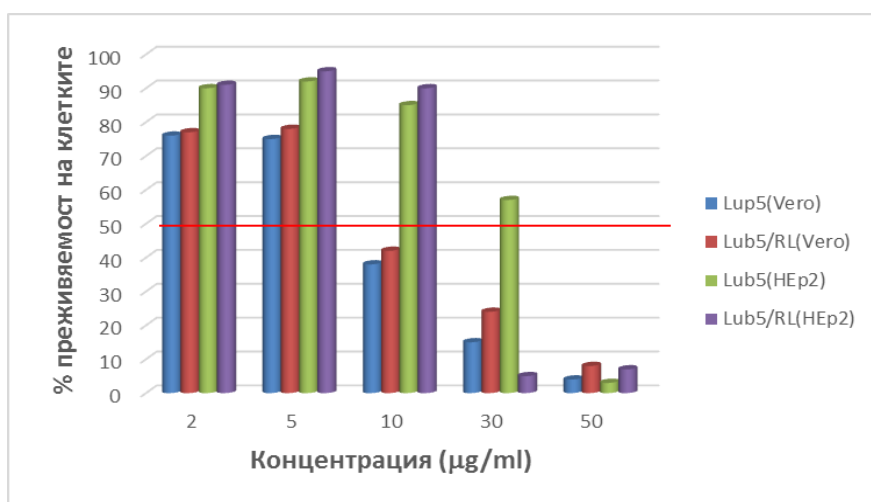


Фиг . 17. Цитотоксичен ефект на Lub 4

4.2.2. Оценка на цитотоксичния ефект на Lub 5

Проследяването на цитотоксичния ефект на Lub 5 при Vero и HEp2 клетки дава основание субстанцията да бъде охарактеризирана като силно цитотоксична. Освен това, проведените експерименти разкриха, че нормалните клетки проявяват по-голяма чувствителност към този инхибитор. Lub 5 в концентрация до 30 µg/ml не предизвиква цитотоксичен ефект при HEp2 линията, докато преживяемостта на Vero клетките спада под 50% при концентрация 10 µg/ml (фиг. 18). В присъствието на RL, жизнеспособността пренебрежимо слабо се повишава, без да бъде достигнат прага на безвредност. В същото време, известно недоумение поражда факта, че комплексът 30 µg/ml Lub 5 с RL се оказва силно цитотоксичен при HEp2 линията.

Получените резултати показаха, че ефикасните концентрации, при които Lub 5 има антибактериално действие са токсични също и за еукариотните клетки. С изключение на MIC Lub 5 при *Alcaligenes faecalis* 6132 (5 µg/ml) и MIC Lub 5/RL при *Bacillus subtilis* 168 (2 µg/ml), установените при останалите моделни щамове MICs надвишават прага на цитотоксичност. Въпреки доказаното мощно антимикробно действие на Lub 5, натрупаните данни не аргументират уместна терапевтична приложимост.

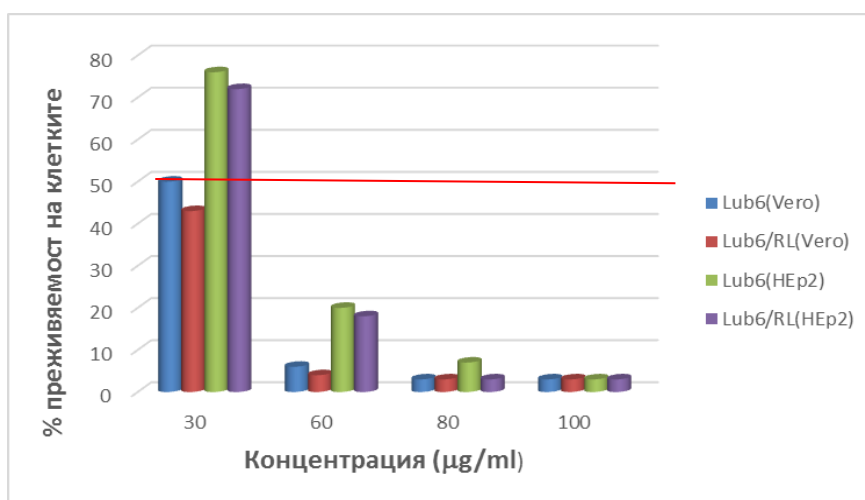


Фиг. 18. Цитотоксичен ефект на Lub 5

4.2.3. Оценка на цитотоксичния ефект на Lub 6

Както при Lub 5, цитотоксичният ефект на Lub 6 върху Vero клетките е по-силно изразен. При концентрация на инхибитора 30 µg/ml, преживяемостта на нормалните клетки не надхвърля 50%. При същата концентрация, 76% от HEp2 клетките запазват жизнеспособността си (фиг. 19). С увеличаване на концентрацията на 60 µg/ml се проявява цитотоксичното действие на Lub 6 и върху туморните клетки (оцеляват едва 20%). И при двете клетъчни линии, комбинирането с RL не оказва смекчаващо действие върху цитотоксичността на Lub 6.

Антимикробната активност на Lub 6 при самостоятелно приложение се проявява в концентрация над 70 µg/ml. Това е най-ниската регистрирана MIC при моделните щамове (при *Pseudomonas aeruginosa* 1390). В присъствие на RL, MICs се понижават значително - до 30 µg/ml при *Bacillus subtilis* 168 и *Alcaligenes faecalis* 6132. Тази концентрация съвпада с установената CC 50 при Vero клетките. Съпоставянето на установените MICs с прага на цитотоксичност налагат извода, че субстанцията е неприложима като антимикробен агент поради несъвместимост с изискването за безвредност.



Фиг. 19. Цитотоксичен ефект на Lub 6

1,4-нафтохиноновите производни, използвани в това проучване, имат в структурата си различни заместени групи, които вероятно определят различната

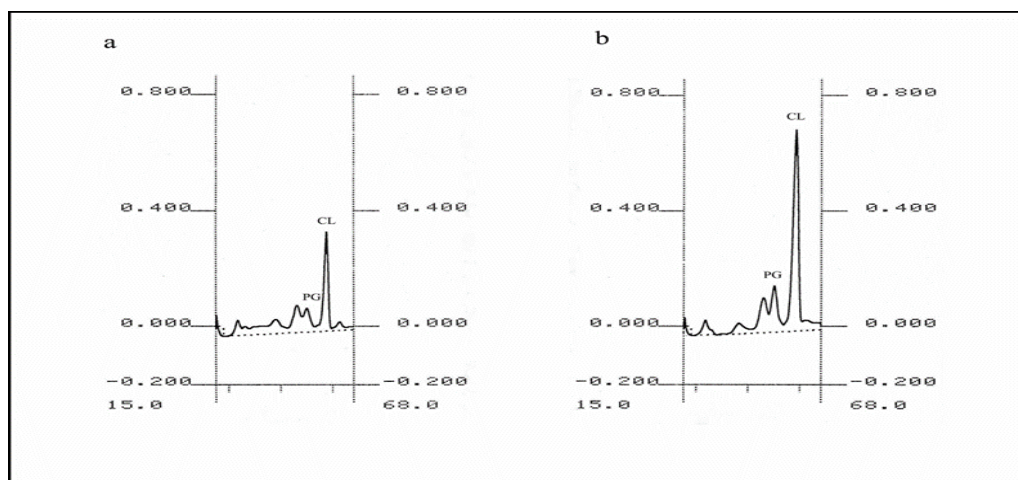
им антимикробна активност и цитотоксичност. Редокс-потенциалът на хиноновата структура се влияе от позицията и броя на серните и азотните атоми (и/или пръстени) в страничните вериги (Tuun et al., 2015; Ibis et al., 2016). Повишената ефикасност на окислително-редукционния цикъл усилва цитотоксичността (Kishore et al., 2014). Дължината на веригата на заместителите също дава отражение върху механизма на действие, който определя различни биологични свойства (Sreshta, 2016). Най-слаба чувствителност при всички изследвани щамове и относително по-слаба цитотоксичност беше установена при Lub 4, който съдържа *p*-толил в страничната верига. Получените резултати предполагат, че по-високата антибактериална активност и силна цитотоксичност на другите два 1,4-нафтохинонови деривата е свързана с наличието на 4-аминофенилови групи при Lub 6 или ацетилирани amino-групи (4-ацетамидофенил) при Lub 5.

5. Изследване на промените в бактериалната клетъчна мембрана под действие на рамнолипид - биосърфактант

Повърхностните структури на микробните клетки служат като ефективна защитна бариера срещу проникване на антимикробни агенти. В присъствие на RL е отчетено увеличение в количеството екстрацелуларен протеин при изследваните щамове, което предполага повишен пермеабилитет на клетъчната мембрана и промени в структурата ѝ.

5.1. Влияние на рамнолипид-биосърфактант върху фосфолипидния състав на бактериалната мембрана на *Bacillus subtilis* 168

Липидни екстракти от клетки, култивирани до късна експоненциална фаза в отсъствие и присъствие на RL (10 µg/ml) бяха анализирани чрез двупосочна 2D - TLC. Бяха установени четири фосфатсъдържащи фракции, идентифицирани на базата на техните хроматографски свойства като: дифосфатидилглицерол (кардиолипин) (CL), фосфатидилглицерол (PG), фосфатидилетаноламин (PE) и лизилфосфатидилглицерол (LPG). Количеството на отделните фосфолипидни фракции беше определено денситометрично (фиг. 20).



Фиг. 20. Денситограми на липидните екстракти от клетки на *Bacillus subtilis* 168, култивирани в отсъствие (а) и в присъствие (b) на RL (10 µg/ml)

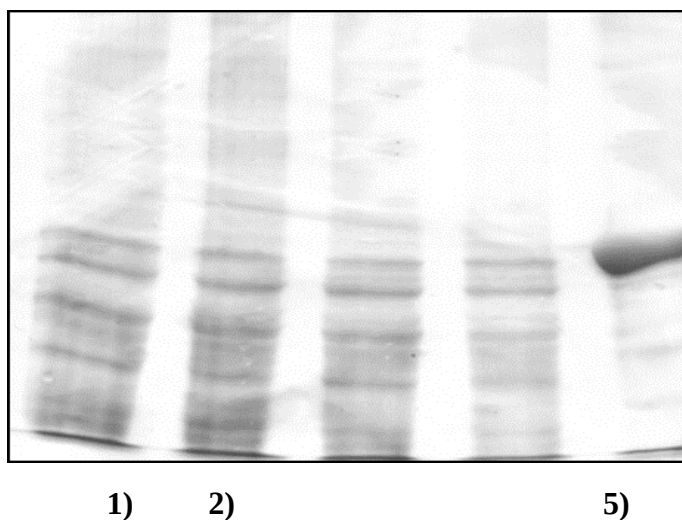
При контролните клетки най-застъпеният компонент е CL (32.9%), следван от PE (16.0%), PG (12.9%) и LPG (3.2 %) (фиг. 20a). Анализът на липидните екстракти от клетки, култивирани в присъствие на биосърфактанта показва количествени, но не и качествени промени във фосфолипидите. Регистрирано е увеличаване на количеството на CL и PG. Както се вижда от фиг. 20 (b) значително нараства съдържанието на CL (до 54.8 %) и по-малко това на PG (15.5%). Количеството на PE се понижава до 13.7% , а на LPG до 2.1 % респективно. Количественото определяне на получените фосфолипидни профили показва, че в присъствие на рамнолипид се увеличават отрицателно заредените фосфолипиди в липидния бислой на бактериалната мембрана. Това води до относително стабилизиране на мембраната, което представлява защитен механизъм, чрез който клетката ограничава токсичното действие на биосърфактанта. Физичните свойства на кардиолипина определят взаимодействия, които са от решаващо значение за структурната организация на биологичните мембрани. Тези взаимодействия могат да доведат до формиране на мембранни домейни, до кръстосано свързване на протеини и образуване на недвуслойни структури. CL има по-висока температура на топене от PE (с 10⁰C по-висока) и повишеното му количество води до намаляване флуидитета на мембраната, като по този начин се получава стабилизиращ ефект. От друга

страна, високото съдържание на анионни фосфолипиди в присъствието на биосърфактанта може да улесни електростатичните взаимодействия и да повиши мембранната чувствителност към изследваните вещества, които са положително заредени. Катионни антимикуробни агенти също предизвикват образуването на домейни в бактериалната мембрана, което води до увреждането ѝ.

Промените в мембранните фосфолипидни структури при патогенните микроорганизми могат да се разглеждат като адаптивен механизъм към средата на гостоприемника, който увеличава резистентността им към продуцираните от имунната система антимикробни пептиди (Zhang and Rock, 2008).

5.2. Анализ на белтъчния компонент на бактериалната мембрана на *Bacillus subtilis* 168

Проведените изследвания установиха, че присъствието на RL (10 µg/ml) не оказва съществено влияние върху белтъчния компонент на клетъчната мембрана при *Bacillus subtilis* 168. Беше регистрирано незначително понижение в количеството на нискомолекулните белтъци (фиг.21).



Фиг. 21. SDS-PAGE на мембранните протеини на *Bacillus subtilis* 168:

1) нетретирани клетки; 2) мембранни протеини на клетки, третирани с 10 µg/ml RL; 5) протеинови маркери: цитохром с (13 kDa), яйчен албумин (45 kDa), говежди албумин (67 kDa)

6. Изследване влиянието на синтетични тиосулфонати и техния комплекс с RL върху клетъчната ултраструктура на моделни щамове Грам (+) и Грам (-) бактерии чрез флуоресцентна конфокална микроскопия (CLSM) и сканираща електронна микроскопия (SEM)

Беше проучен ефектът на MTS, RL и техния комплекс върху морфологията и клетъчната повърхност на пропускливостта на мембраната на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168. За целите на микроскопските анализи, MTS е прилаган в концентрация 50 µg/ml. Тази концентрация и при двата щаме е сублетална при самостоятелно приложение на инхибитора и бактерицидна в присъствие на RL (10 µg/ml). Клетките бяха култивирани до ранна експоненциална фаза и след добавяне на RL, MTS и MTS/RL, клетъчните суспензии бяха инкубирани за още 60 min при 37°C.

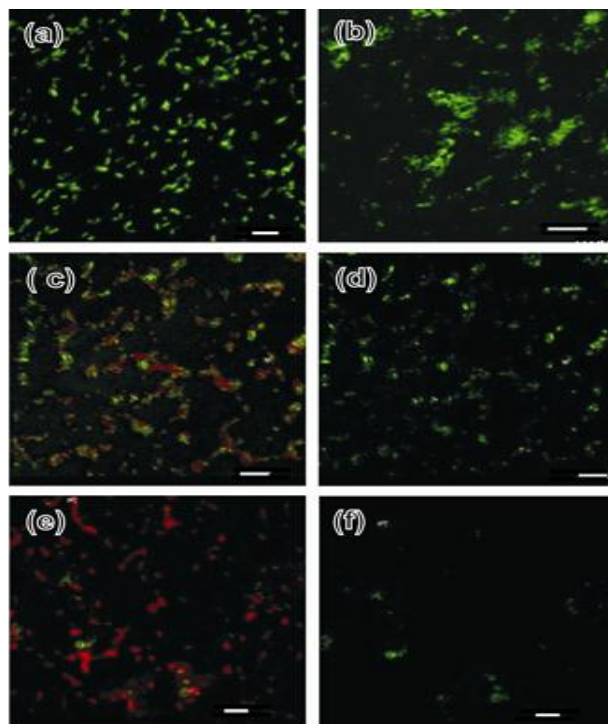
6.1. Изследване на промените в повърхностните клетъчни структури на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168 в присъствие на MTS и MTS/RL чрез флуоресцентна конфокална микроскопия (CLSM)

Промените в пропускливостта на мембраната бяха проследени чрез CLSM. Използваният Live/Dead viability kit дава възможност да се оцени жизнеспособността на клетките в зависимост от целостта на тяхната мембрана. Клетките с увредени мембрани се оцветяват в червено, а жизнеспособните клетки – в зелено.

6.1.1. Влияние на MTS и MTS/RL върху пропускливостта на мембраната при *Pseudomonas aeruginosa* 1390

Зелената флуоресценция на инкубираните в присъствие на RL клетки показва, че те са с интактни мембрани (фиг.22b). За разлика от клетките в контролната проба, които са отделни (фиг. 22a), третираните с биосърфактант образуват съвкупности, което предполага промени в повърхностните им характеристики (фиг.22b). Прилагането на 50 µg/ml MTS води до формиране на групи от прилепнали клетки, оцветени в зелено или червено (фиг. 22c). Въпреки ясната индикация за навлизане на PI в клетките, значителна част от бактериите са

с ненарушена пропускливост на мембраната. Това е добре илюстрирано при изключен червен сигнал (фиг. 22d). При клетките, подложени на комплексното действие на MTS/RL доминира червеното оцветяване и се наблюдава минимално количество клетки със здрави мембрани (фиг. 22f).

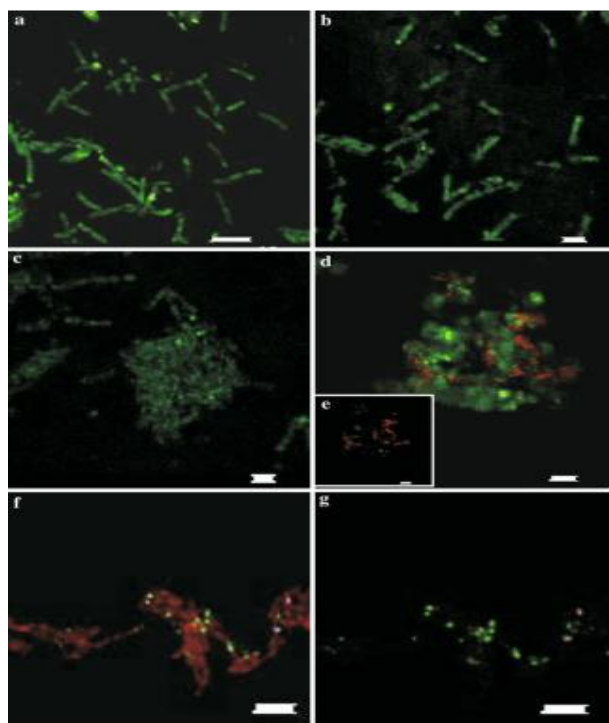


Фиг. 22. Оценка на клетъчната жизнеспособност на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 чрез CLSM: а) Нетретирани клетки; б) Клетки, третирани с 10 µg/ml RL; в) Клетки, третирани с 50 µg/ml MTS; д) (в) при изключен червен сигнал; е) Клетки, третирани с 50 µg/ml MTS/10 µg/ml RL; ф) (е) при изключен червен сигнал. Scale bar = 4 µm.

6.1.2. Влияние на MTS и MTS/RL върху пропускливостта на мембраната при *Bacillus subtilis* 168

Микроскопският анализ не показва видими различия между контролните клетки и третираните само с RL (фиг. 23a,b). Мембраните на клетките след експозиция на 50 µg/ml MTS също не са увредени, но присъствието на антимикробния агент води до промени в адхезивните им свойства. Наблюдава се агрегация на клетките (фиг. 23c). В някои агрегати се съдържат дифузни аморфни инградиенти, оцветени в червено (фиг. 23d,e). Това вероятно е в резултат на изтичане на ДНК от увредените клетки. Флуоресцентните микроскопски

изследвания разкриват значителни промени в пропускливостта на мембраната на клетките, третирани с 50 $\mu\text{g/ml}$ MTS/RL. Множеството оцветени в червено клетки свидетелстват за навлизане на пропидиевия йодид през разрушените мембрани (фиг. 23f). Липсват жизнеспособни клетки, но се наблюдават единични неувредени спори с големина 2 μm (фиг.23g).



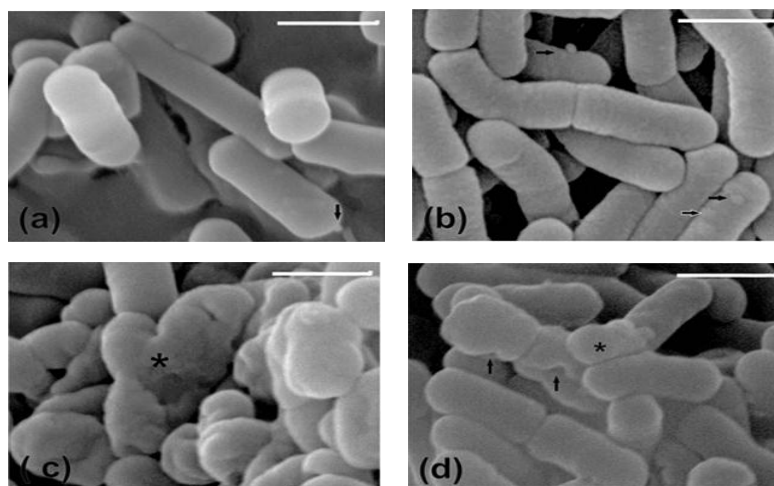
Фиг. 23. Оценка на клетъчната жизнеспособност на *Bacillus subtilis* 168 чрез CLSM :a) Нетретирани клетки; b) Клетки, третирани с 10 $\mu\text{g/ml}$ RL; c–e) Клетъчни агрегати, формирани след третиране с 50 $\mu\text{g/ml}$ MTS; d) дифузен аморфен материал; e) включен само червен сигнал; f) Клетки, третирани с 50 $\mu\text{g/ml}$ MTS/10 $\mu\text{g/ml}$ RL; g) включен само зелен сигнал. Scale bar = 4 μm .

6.2. Изследване влиянието на MTS и MTS/RL върху морфологията и клетъчната повърхност на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168 чрез сканираща електронна микроскопия (SEM)

Сканиращата електронна микроскопия (SEM) визуализира промените в морфологията и клетъчната повърхност на двата щама, настъпили под въздействие на MTS и RL, приложени самостоятелно и в комбинация.

6.2.1. Влияние на MTS и MTS/RL върху морфологията и клетъчната повърхност при *Pseudomonas aeruginosa* 1390

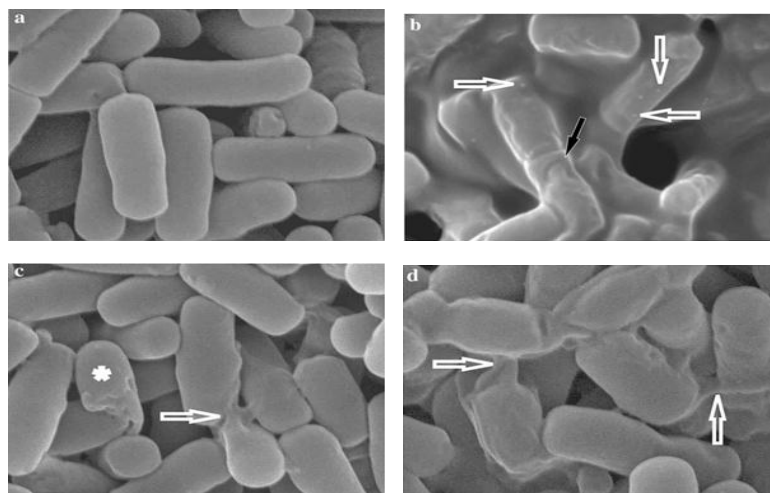
При експерименталните условия на контролата, клетките на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 са с дебелина около 0.5 μm и дължина, варираща от 1 до 2 μm . Повечето от тях имат гладка повърхност, в редки случаи се наблюдават единични малки блебове (фиг. 24a). Повърхността на третираните с RL клетки е вълниста и блебове се установяват много по-често (фиг.24b). Тези ефекти се отнасят основно до повърхностния релеф. Третираните с MTS клетки повсеместно се характеризират с деформирана структура, раздуване и слепване (Фиг.24c,*). Комбинирането на MTS с RL провокира промени в морфологията - клетките не са раздути, но се появяват дълбоки инвагинации, а находката на разкъсани бактерии (фиг. 24d, *) е често явление.



Фиг. 24. Въздействие на MTS и MTS/RL върху морфологията и клетъчната повърхност на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 (SEM): а) Нетретираните клетки; б) Клетки, третираните с 10 $\mu\text{g/ml}$ RL; в) Клетки, третираните с 50 $\mu\text{g/ml}$ MTS; д) Клетки, третираните с 50 $\mu\text{g/ml}$ MTS/10 $\mu\text{g/ml}$ RL. (Стрелки в (а) и (б) – блебове в клетъчната повърхност, в (д) – дълбоки инвагинации; * в (с) - деформирана клетка, в (д) – прекъсната наполовина клетка). Линейна скала = 1 μm .

6.2.2. Влияние на MTS и MTS/RL върху морфологията и клетъчната повърхност при *Bacillus subtilis* 168

Микроскопските наблюдения демонстрират гладки повърхности и отчетливи очертания на клетките в контролната проба (фиг.25a). Самостоятелно приложен в концентрация 10 µg/ml, рамнолипидът оказва подчертан ефект върху клетъчния релеф – формират се клетъчни вгъвания и малки блебове (фиг.25b). При третиране само с MTS се виждат остатъци от разрушени мембрани или мукозен материал, който се наслабва по повърхността на съседни клетки. Рядко се наблюдават разрушени клетки (фиг.25c). След прилагане на комбинация от MTS/RL, клетъчната повърхност се променя значително – видими са силни нагъвания, смалени повърхности. Голямо количество мукозен материал, образуващ пластове се натрупва в междуклетъчното пространство. Преобладават разрушени клетки или такива с деформирана структура (Фиг.25d).



Фиг. 25. Въздействие на MTS и MTS/RL върху морфологията и клетъчната повърхност на *Bacillus subtilis* 168 (SEM): a) Нетретирани клетки; b) Клетки, третирани с 10 µg/ml RL; c) Клетки, третирани с 50 µg/ml MTS; d) Клетки, третирани с 50 µg/ml MTS/10 µg/ml RL. (В (b): бели стрелки – блебове в клетъчната повърхност, черна - инвагинация на клетъчната повърхност; в (c): звезда -деформирана клетка, бяла стрелка – изтичане на мукозно вещество и слепване на 3 клетки; в (d) – стрелки - мукозни изливи). Линейна скала = 1 µm.

Направените микроскопски анализи имаха за цел да съпоставят резултатите, получени при микробиологичните и биохимичните изследвания, и да изяснят връзката между кумулативното действие на веществата и интегритета на повърхностните клетъчни структури. И при двата щама, наблюденията свидетелстват за изменения в клетъчната структура при самостоятелно действие на MTS и RL, но те не водят до инхибиране на бактериалния растеж. Визуализираните чрез SEM промени при третираните с MTS клетки доказват освобождаване на мембранен материал, което е свързано с образуване на клетъчните агрегати, наблюдавани при CLSM анализа. Случайното изтичане на ДНК от единични увредени клетки е възможно, но не е типично за повечето клетки. В същото време комбинираното прилагане на MTS и RL има силно изразен бактерициден ефект, дължащ се на трайни увреждания и разрушаване на клетките. Доказаните промени в повърхностните клетъчни структури в присъствие на бисърфактанта не предизвикват инхибиращ ефект, но са достатъчни да улеснят проникването на тиосулфоната, което води до клетъчна смърт. Направените изследвания доказват високата ефективност на RL за намаляване на дозата на антимикробните препарати. Комбинираното прилагане на двете вещества има силно изразено бактерицидно действие, което се дължи на трайни увреждания и разрушаване на клетките.

7. Изследване въздействието на MTS, RL и MTS/RL върху клетъчния отговор на моделни щамове Грам (-) и Грам (+) бактерии

7.1. Проследяване на промените в ключови метаболити при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168

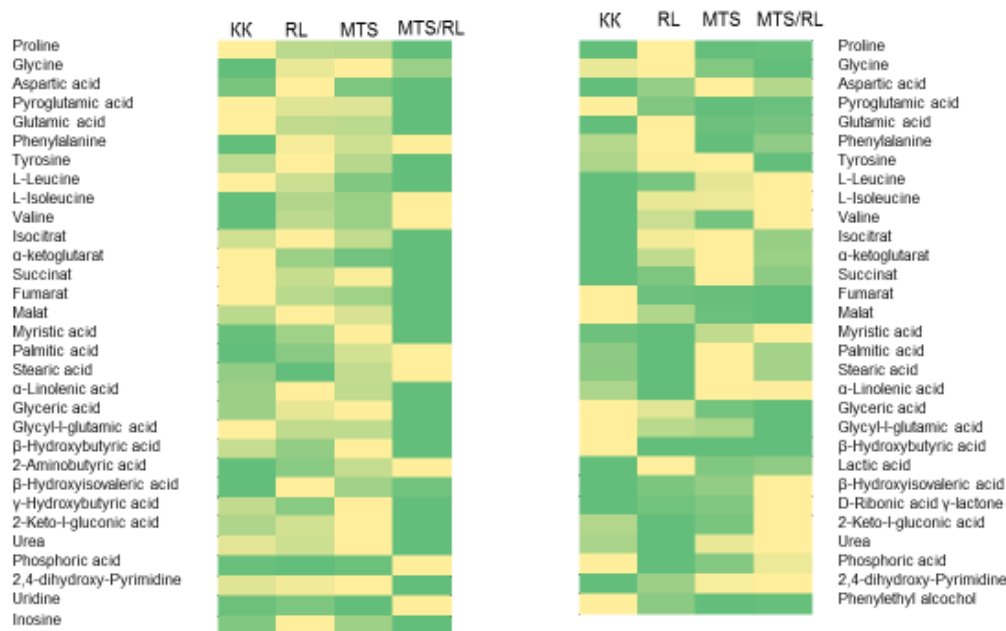
В различни условия на стрес, микроорганизмите реагират чрез цялостно препрограмиране както на първичния, така и на вторичния метаболизъм, което рефлектира в биохимичния им профил. Анализът на интрацелуларните съединения, идентифицирани в клетки на *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168, предоставя възможност за съпоставка на метаболитната активност при растеж в присъствие и отсъствие на изследваните вещества. Резултатите от

проведените експерименти доказаха настъпването на промени във физиологичния статус на клетките при експозиция в продължение на 1 h на MTS (50 µg/ml), RL (10 µg/ml) и техния комплекс (50 µg/ml MTS/10 µg/ml RL). Графичната визуализация на метаболитните профили е представена чрез Heat maps.

Метаболомните анализи демонстрираха, че изследваните вещества предизвикват и при двата щама значителни отклонения от нормалните нива на голяма част от продуктите на основни метаболитни пътища при бактериите - цикъл на Кребс, биосинтеза на мастни киселини, метаболизъм на аминокиселини, метаболизъм на пурины и пиримидини и т.н. Идентифицираните метаболити включват редица междинни продукти от централния въглероден метаболизъм като аминокиселини, органични и мастни киселини, нуклеотиди. Регистрирани са както увеличения, така и намаления в относителните им концентрации, което предполага комплексен отговор на клетката срещу действието на антимикробния агент. Настъпването на клетъчна смърт е прогресивен процес, обхващащ цялостната метаболитна активност.

При *Pseudomonas aeruginosa* 1390 бяха установени 36 съединения общо. Интрацелуларните нива на 19 от тях са по-ниски при третираните клетки спрямо контролните, а на 10 – по-високи. Най-голямо отклонение от нормалните нива на метаболитите се регистрира при въздействие с комплекса MTS/RL. Силно понижени са относителните концентрации на редица органични киселини: β-хидроксимаслена, глицеринова, 2-кето-глюконова, глицил-глутаминова, α-хидрокси-глутарова, ябълчна, янтарна, фумарова, изолимонена, както и на уреата. С повишени нива са фосфорната киселина, уридина, 2-аминобутирата.

При *Bacillus subtilis* 168 са идентифицирани общо 45 метаболита, като при 32 от тях има изразена флукутация. Повишени са относителните нива на някои органични киселини: млечна, β-хидрокси-изовалерова, янтарна, α-хидрокси-глутарова, D-рибонова киселина –γ-лактон, 2-кето-глюконова, α-хидрокси-глутарова. Понижение има при глицериновата и глицил-глутаминовата киселина.



а) *Pseudomonas aeruginosa* 1390

б) *Bacillus subtilis* 168

Фиг. 26. Heat maps на метаболитните профили на: а) *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и б) *Bacillus subtilis* 168 (- повишаване - намаляване спрямо относителната концентрация на метаболита в контролната проба)

7.2. Влияние на MTS, RL и MTS/RL върху цикъла на Кребс при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168

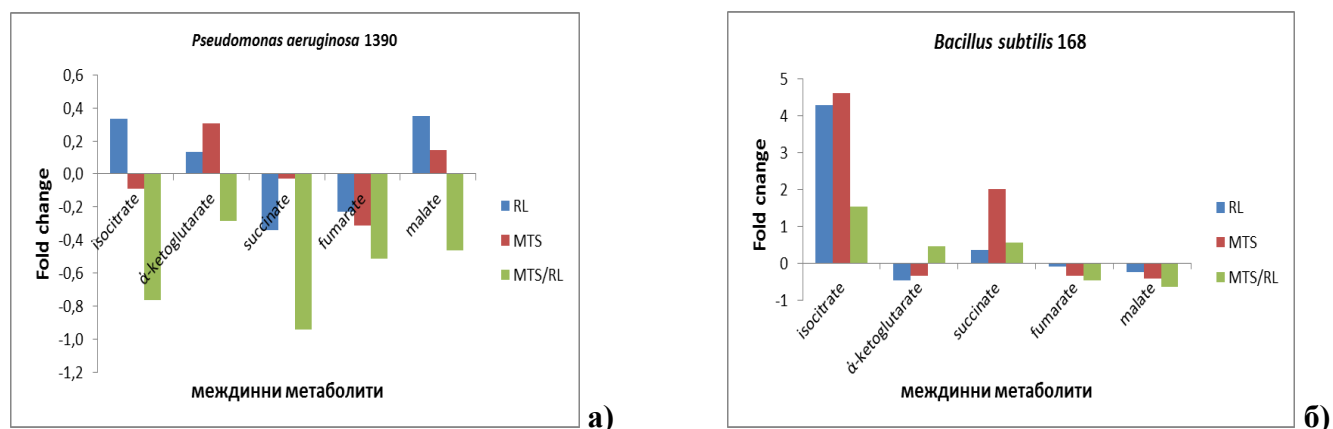
Метаболитните профили и на двата щама дават ясна индикация за сериозно нарушение в цикъла на Кребс при третираните клетки.

При *Pseudomonas aeruginosa* 1390 в присъствие на MTS и RL поотделно, нивата на ключовите метаболити от цикъла на Кребс, са незначително понижени, което обяснява липсата на инхибиращ ефект на изследваните вещества в тези концентрации. Техният комплекс обаче индуцира промени в метаболизма, които водят до многократно намалени нива на всички междинни продукти от цикъла (фиг. 27а). Ниското ниво на α -кетоглутарат води до нарушение в глутаматния метаболизъм и съответно до понижение в нивото на глутамат.

При *Bacillus subtilis* 168 също се забелязват значителни отклонения в нивата на междинните продукти от цикъла на Кребс в присъствие на изследваните вещества. Нивата на сукцинат, изоцитрат и α -кетоглутарат са чувствително

повишени спрямо контролните клетки, особено при въздействие на MTS (фиг. 27б). Съответно относителните концентрации на малат и фумарат са нищожно ниски. Тези промени най-вероятно са свързани с нарушения в глиоксалатния цикъл.

И при двата щама, междинните метаболити от ЦТК с най-голямо отклонение в относителните концентрации са изоцитрат и сукцинат.



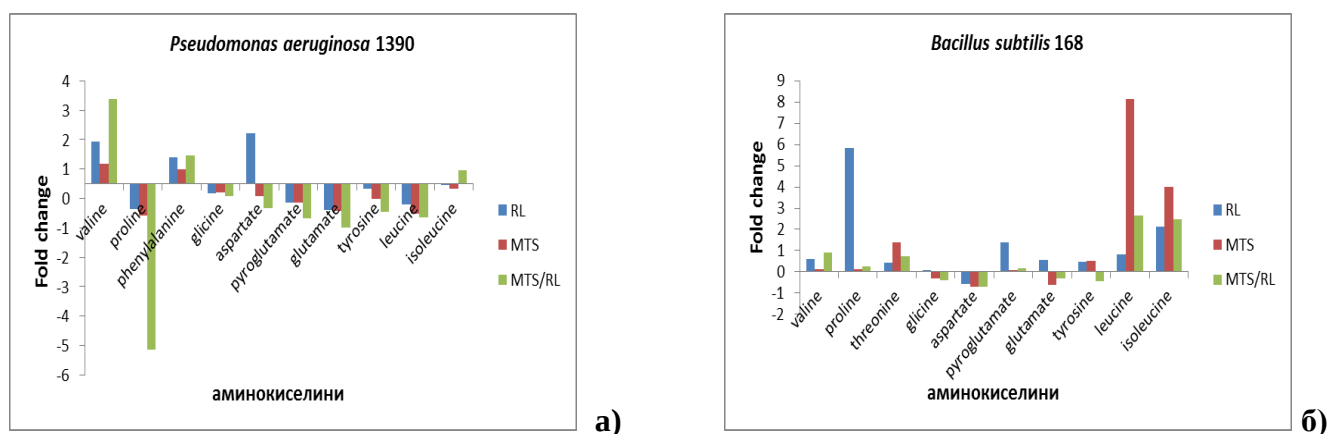
Фиг. 27. Влияние на MTS, RL и MTS/RL върху цикъла на Кребс при: а) *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и б) *Bacillus subtilis* 168

7.3. Влияние на MTS, RL и MTS/RL върху аминокиселинния метаболизъм при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168

Проследяването на въздействието на изследваните вещества установи вариации в интрацелуларната наличност на редица аминокиселини и при двата щама. При *Pseudomonas aeruginosa* 1390 нивата на пролин, глутамат и пироглутамат в третираните поотделно с MTS и RL клетки са по-ниски в сравнение с контролата, а комплексът MTS/RL предизвиква драстичен спад. Същевременно значително покачване се наблюдава при валин и изолевцин, а също и при фенилаланин. Някои аминокиселини имат най-високи нива в присъствие на RL. Такива са аспартат (трикратно увеличение) и тирозин, но и при тях има понижение при въздействие с комплекса (особено при тирозин) (фиг. 28а).

Аминокиселинният профил на третираните клетки на *Bacillus subtilis* 168 е силно променен и отразява сериозната намеса на проучваните инхибитори върху

биосинтетичните пътища. Интересно е, че в присъствие на RL нивата на пролин, глутамат и пироглутамат, а също и на тирозин, са чувствително повишени. Най-силно изразена е разликата при пролин (фиг. 28б). Той има стабилизиращи свойства, спомага за правилното нагъване на протеините при неблагоприятни условия. Освен това е известно, че *Bacillus subtilis* акумулира големи количества пролин чрез *de novo* синтез като адаптивния отговор към високо осмотичен стрес (Brill *et al.*, 2011). Вероятно е увеличението в пролиновия интрацелуларен запас да е провокирано от дезинтеграцията на клетъчната мембрана на *Bacillus subtilis* 168 при въздействие с RL. Значителният спад в нивото на аспартата при въздействие с RL, MTS и MTS/RL е сигнал за намалена доставка на оксалацетат и косвено доказателство за намеса в глиоксалатния цикъл. В третираните с MTS/RL клетки, относителните нива на глутамат, глицин и тирозин са по-ниски спрямо контролата. Понижението в относителното интрацелуларно количество глутамат в присъствието на MTS и MTS/RL предполага сериозно забавяне на азотния метаболизъм. Увеличава се нивото на валин, пролин, треонин, пироглутамат, и особено на левцин и изолевцин. Значителното увеличение в относителните нива на трите аминокиселини с разклонена верига (ILV) в присъствие на MTS и MTS/RL е косвено потвърждение за намеса в основни метаболитни пътища, които са под контрола на плейотропните транскрипционни регулатори (Sonenshein, 2007; Brinsmade *et al.*, 2010).



Фиг. 28. Влияние на MTS, RL и MTS/RL върху аминокиселинния метаболизъм при:

а) *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и б) *Bacillus subtilis* 168

7.4. Влияние на MTS, RL и MTS/RL върху биосинтеза на нуклеотиди при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168

Анализът на представените метаболитни профили недвусмислено сочи за затормозен нуклеотиден биосинтез при *Pseudomonas aeruginosa* 1390. При самостоятелно приложение на изследваните вещества, относителната концентрация на пуриновия прекурсор инозин нараства спрямо контролните клетки. Повишението е по-слабо при третиране с MTS, но в присъствие на рамнолипида е значително. При действие на комплекса MTS/RL обаче има силно понижение. Интересно е, че същата тенденция следва флукутацията в нивата на аспартата. Този факт, както и силно редуцираното ниво на другия донор на аминок-група (глутамата) в присъствие на MTS/RL, дава основание да се предположи взаимовръзка с ниското ниво на пуриновия прекурсор инозин.

Сериозно компрометиран е и пиримидиновия биосинтез. В присъствие на RL се наблюдава покачване в относителната концентрация на уридина, но не толкова добре изразена колкото при инозина. Въздействието на комплекса MTS/RL провокира значителни отклонения в нивата на пиримидиновите производни. За разлика от пуриновия прекурсор, уридинът нараства неколkokратно. Същевременно нивото на урацил (2,4-дихидрокси-пиримидин) е 10 пъти по-ниско отколкото в нетретираните клетки.

При *Bacillus subtilis* 168 относителната концентрация на 2,4-дихидрокси-пиримидина чувствително се повишава при въздействие на изследваните вещества. В присъствие на RL увеличението е четирикратно, но при MTS разликата нараства до 8 пъти. Най-силен ефект има комплексът MTS/RL. Това подсказва за разбалансиран пиримидинов биосинтез и при този щам.

И при двата щам, под въздействие на MTS/RL, нивото на глутамата - основен донор на аминок-група при биосинтеза на нуклеотиди е силно понижено, което вероятно затормозява биосинтеза на нуклеотиди.

7.5. Влияние на MTS, RL и MTS/RL върху мастнокиселинния биосинтез при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Bacillus subtilis* 168

Получените резултати показват, че изследваните вещества предизвикват значителни промени в мастнокиселинния метаболизъм и при двата щама.

В присъствие на RL при *Pseudomonas aeruginosa* 1390 се регистрират по-големи количества наситени мастните киселини с по-нисък фазов преход (C14:0) и ненаситени мастни киселини (C18:3), което води до повишаване на флуидитета на мембраната. При третираните с MTS и MTS/RL клетки нараства количеството на наситените мастни киселини с по-висок фазов преход (C16:0, C18:0), докато наситените мастни киселини с по-нисък фазов преход (C14:0) и ненаситените намаляват, вследствие на което се усилва ригидността на бактериалната мембрана, което е защитен механизъм на клетката. И в двата случая промените не водят до инхибиране на растежа на *Pseudomonas aeruginosa* 1390. Провокираното от въздействието на RL нарастване на флуидитета на мембраната улеснява проникването на MTS в клетката.

Анализът на мастнокиселинния профил на *Bacillus subtilis* 168 констатира по-богат състав отколкото при *Pseudomonas aeruginosa* 1390. Освен миристинова, палмитинова, стеаринова и α -линоленова киселина, бяха установени също капронова (C10:0), лауринова (C12:0) и докозанова (C22:0) киселини. В присъствие на RL, нивата на наситените мастни киселини C14, C16, C18 и C18:3 се понижава спрямо контролните клетки, докато при въздействие на MTS и MTS/RL тяхното количество се увеличава. Най-чувствително се повишава количеството на C14. В присъствие на комплекса MTS/RL количествата на наситените мастни киселини с нисък фазов преход се понижават. Значителното повишение в нивото на ненаситените мастни киселини при комбинираното прилагане на веществата е доказателство за нарушена мембранна функция. Количеството на C22:0 също е по-ниско.

Получените резултати потвърждават, че промените, които настъпват в повърхностните клетъчни структури в присъствие на RL улесняват проникването

на MTS във вътрешността на клетката. Комбинираното прилагане на антимикробния агент и RL води до необратими промени в клетъчния метаболизъм и клетъчна смърт.

Изводи

1. Синтетичните тиосулфонил-производни (метил-тиосулфонат (MTS) и етил-тиосулфонат (ETS)) са субстанции с бактерициден капацитет при всички изпитвани щамове. Най-висока чувствителност показва *Alcaligenes faecalis* 6132.
2. MTS е с по-силно изразен бактерициден и спороциден ефект в сравнение с ETS.
3. Тиосулфонил-производните не проявяват селективно действие по отношение на Грам (+) и Грам (–) бактерии.
4. В присъствие на RL значително се понижават MICs и особено MBCs на двата тиосулфоната при *Bacillus subtilis* 168, *Pseudomonas aeruginosa* 1390 и *Alcaligenes faecalis* 6132. Взаимодействието между RL и синтетичните тиосулфонил-производни при двата щама *Escherichia coli* е индиферентно.
5. Синтетичните 1,4-нафтохинонови деривати (Lub4, Lub5 и Lub6) нямат бактерициден капацитет. Ефектът е бактериостатичен при *Bacillus subtilis* 168 и *Pseudomonas aeruginosa* 1390.
6. *Escherichia coli* W 1655 е резистентен към проучваните 1,4-нафтохинонови деривати. *Alcaligenes faecalis* 6132 е резистентен към Lub4 и Lub6, но силно чувствителен към Lub5.
7. Lub5 е с най-добре изразена антимикробна активност. Най-слабо антибактериално действие има Lub4.
8. RL силно потенцира действието на трите 1,4-нафтохинон-производни инхибитори, но бактерициден ефект не се регистрира при нито един от изследваните щамове.
9. Комбинираното прилагане на MTS и Lub5 показва възможен синергизъм при Грам (–) щамове.
10. MTS, ETS и RL нямат цитотоксично действие при Vero и HEp-2 клетки. В присъствие на RL, преживяемостта на клетките се повишава в сравнение със самостоятелното приложение на инхибиторите.

11. 1,4-нафтохиноновите производни са с изразена цитотоксичност. В комбинация с RL се регистрира минимално повишаване на клетъчната преживяемост.

12. В присъствие на RL (10 µg/ml) при *Bacillus subtilis* 168 настъпват количествени промени във фосфолипидния състав на бактериалната мембрана - повишено количество на анионните фосфолипиди (кардиолипин и фосфатидилглицерол). Количеството на нискомолекулните белтъци незначително намалява.

13. Под въздействие на MTS и особено при комбинираното прилагане на MTS и RL настъпват морфологични промени в клетките и дезинтегриране на повърхностните клетъчни структури при *Bacillus subtilis* 168 и *Pseudomonas aeruginosa* 1390.

14. Въздействието на MTS, RL и техният комплекс предизвиква нарушения в основни метаболитни пътища – цикъл на Кребс, аминокиселинен и мастнокиселинен метаболизъм, метаболизъм на пурини и пиридини и др. и при двата щам.

Приноси

1. Разработен е нов подход за комбинирано приложение на антимикробни агенти и рамнолипид-биосърфактант с цел подобряването на бактерицидния капацитет на веществата и намаляване на тяхната цитотоксичност

2. За първи път са доказани количествени промени във фосфолипидния състав на бактериалната мембрана на *Bacillus subtilis* 168 в присъствие на RL (10 µg/ml), които благоприятстват проникването на инхибиторите в клетката.

3. За първи път е проучено комбинирано прилагане на синтетични аналози на двете групи биологично активни вещества – тиосулфонати и 1,4-нафтохинони и е доказано синергичното им взаимодействие при Грам (-) бактерии.

4. За първи път е проучено влиянието на MTS и RL, приложени самостоятелно и в комплекс върху метаболитния отговор на клетката при *Bacillus subtilis* 168 и *Pseudomonas aeruginosa* 1390.

Публикации и участия в научни форуми

Публикации

1. Sotirova A., Avramova T., **Lazarkevich I.**, Lubenets V., Karpenko E., Galabova D.. Antimicrobial potential of selected thiosulfonates- based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 2010, 63 (9): 1307-1314 (IF 0,219)
2. Sotirova A., Avramova T., Stoitsova S., **Lazarkevich I.**, Lubenets V., Karpenko E., Galabova D. The importance of rhamnolipid- biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates. *Current Microbiology*, 2012, 65: 534-541 (IF 1.52)
3. Sotirova A., Avramova T, **Lazarkevich I.**, Lubenetz V, Karpenko O.,Galabova D. Antibacterial Potential of Novel Synthetic Derivatives of 1,4-Naphthoquinone and Their Complexes with Biosurfactants. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2014, 5(4), 530-541 (IF 0,35)
4. **Lazarkevich I.**, Sotirova A., Avramova T., Stoitsova S., Paunova-Krasteva T., Galabova D. Antibacterial Activity of Methylthiosulfonate and Its Complexes with Rhamnolipid and Trehalose lipid against *Pseudomonas aeruginosa* NBIMCC 1390. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2015, 6(2): 282 - 290 (IF 0,25)
5. **Lazarkevich I.**, Sotirova A., Avramova T., Galabova D. Comparative study on antibacterial activity of synthetic analogues of biologically active compounds and their combination with rhamnolipid- biosurfactant. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 2015 SE/ONLINE: 55-62

Участия в научни форуми

1. Sotirova A., Avramova T., **Lazarkevich** I., Lubenets V., Karpenko E., Galabova D. Antimicrobial potential of selected thiosulfonates–based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi. 12-ти Конгрес на българските микробиолози с международно участие, Юндола, 11 - 15 октомври, 2010
2. Sotirova A., Avramova T., Stoitsova S. , **Lazarkevich** I., Lubenets V., Karpenko E., Galabova D. Synergistic effect of methylthiosulfonate and rhamnolipid biosurfactant on *Pseudomonas aeruginosa* 1390 and *Bacillus subtilis* 168. Microbiologia Balkanica, Белград , 25 - 29 октомври 2011
3. **Lazarkevich** I., Sotirova A., Avramova T., Galabova D. Antimicrobial potential of synthetic analogues of biologically active compounds. 13 - ти Конгрес на микробиолозите в България с международно участие, Трявна, 7 – 10 октомври, 2014
4. **Лазаркевич** И., Сотирова А., Аврамова Т., Гълъбова Д. Сравнително проучване на антибактериалната активност на синтетични аналози на биологично активни вещества и техните комбинации с рамнолипид – биосърфактант. Втора национална конференция за млади учени „Биологически науки за по-добро бъдеще”, 30-31 октомври 2015, Биологически факултет, Пловдив
5. **Лазаркевич** И., Сотирова А., Аврамова Т., Гълъбова Д. Антимикробна активност на синергични комбинации на биологично активни вещества - X-та Работна среща „Биологична активност на метали, синтетични съединения и натурални продукти”, 17-19 ноември 2015, ИЕМПАМ, София