



Små molekyler från bakterier i kampen mot antibiotikaresistens

Marina aktinomyceter som en lovande källa mot multiläkemedelsresistent *Staphylococcus aureus*

Nadia Albadran

Examensarbete i farmaci 15 hp
Receptarieprogrammet 180 hp
Rapporten godkänd: juni månad 2013
Handledare: Per- Anders Enqvist

Sammanfattning

Introduktion: Antibiotika är de läkemedel som används vid behandling av infektioner som orsakas av bakterier. De flesta antimikrobiella medel isolerades och utvecklades från markbundna aktinomycceter. Eftersom bakterierna *Staphylococcus aureus* som är resistent mot vissa antibiotika har ökat betydligt, började forskare söka efter nya källor till mikroorganismer som producerar nya antibiotika. Marinsediment utgör en ny källa till antibiotika som kämpar mot de resistent bakterier, multiläkemedelsresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA). Naturprodukter är kemiska föreningar som är isolerade från växter, djur eller levande mikroorganismer. De små molekylerna som är sekundära metaboliterna från mikroorganismer utgör en viktig del av naturprodukter eftersom de ofta uppvisar olika biologiska aktiviteter. Aktinomycceter är bakterier som tillhör ordningen Actinomycetales. Det har visats sig att aktinomycceter är en rik källa för biologiskt aktiva sekundära metaboliter. MRSA är den vanligaste orsaken till sårinfektioner. MRSA utövar ett kraftigt motstånd mot penicilliner och penicillinliknande antibiotika (betalaktamantibiotika).

Syfte: Syftet med detta arbete är att undersöka om de små sekundära metaboliterna som härstammar från marina aktinomycceter uppvisar antimikrobiell aktivitet mot MRSA och om de därigenom kan vara en bra källa till nya antibiotika som kan användas mot de resistent bakterier.

Metod: Litteratursökning har huvudsakligen gjorts via PubMed, men även via sökmotorn Google. Sökningen gjordes även efter studier som motsäger syftet av detta arbete. Sökningarna gjordes mellan 2013-04-03 och 2013-04-15.

Resultat: Arbetet bygger på sex forskningsartiklar. I dessa artiklar beskrivs studier som undersöker den potentiella antimikrobiella aktiviteten hos föreningar som isolerades från aktinomycceter mot MRSA. Isolat av aktinomycceter hämtades från olika ställen i olika marina sediment. Den mest använda metoden för att studera aktiviteten hos dessa föreningar är in vitro resistensbestämning. Aktiviteten i närvaro av humant serum har studerats hos vissa föreningar och det visades sig att aktiviteten upphörde i medierna som innehöll serum. Dessa studier uppvisade potenta antimikrobiella aktiviteter hos föreningar som isolerades från aktinomycceter mot MRSA.

Diskussion: De flesta föreningar som isolerades från marina aktinomycceter uppvisade en potent antimikrobiell aktivitet. Dessa undersökningar byggde på bara in vitro-analyser (förutom en studie som använde både in vitro och in vivo). Detta innebär att vissa kinetiska och farmakologiska egenskaper hos dessa föreningar inte har undersökts i dessa studier. Aktiviteten i närvaro av humant serum kan kopplas till tendensen hos en förening att binda sig till plasmaprotein vilket kan vara ett hinder vid en systemisk behandling. Proteinbindning och cytotoxicitet kan utnyttjas eller optimeras genom exempelvis kemiska modifieringar och struktur-aktivitetssamband (SAR) så att ett säkert och effektivt antibiotikum kan erhållas.

Nyckelord: Aktinomycceter, marina mikroorganismer och bioaktiva föreningar.

Innehållsförteckning

Sammanfattning	I
Innehållsförteckning	III
1. Introduktion.....	1
1.1 Antibiotika	1
1.2 Resistensmekanismer	1
1.3 Naturprodukter och sekundära metaboliter.....	1
1.4 Aktinomyceter.....	1
1.5 Marina miljön.....	2
1.6 MRSA	2
2. Syfte	3
3. Metod	3
4. Resultat	3
4.1 Studie 11	3
4.2 Studie 16	7
4.3 Studie 17	10
4.4 Studie 18..	13
4.5 Studie 19	17
4.6 Studie 20	19
5. Diskussion.....	21
6. Slutsats	23
7. Tackord	23
8. Referens	24
3. Förkortningslistan	26

1. Introduktion

Detta är en litteraturstudie som granskar och sammanfattar en del av forskningen kring små molekyler (sekundära metaboliter) som härstammar från vissa bakterier (aktinomycter) och hur dessa kan användas som antibiotika mot resistenta bakterier (MRSA).

1.1 Antibiotika

Antibiotika är ett samlingsnamn för de läkemedel som används vid behandling av infektioner som orsakas av bakterier. Antibiotika påverkar bakteriers celler men däremot påverkar de inte de mänskliga cellerna eftersom cellerna är uppbyggda på olika sätt (1). Antibiotika kan verka antingen som bakteriedödande (bakteriocid) eller tillväxthämmande (bakteriostatiska) (2).

1.2 Resistensmekanismer

Resistenta bakterier är bakterier som överlever en antibiotikabehandling (3). Det finns olika resistensmekanismer för resistenta bakterier, varav de viktigaste mekanismerna är (1, 2):

- De resistenta bakterierna kan modifiera antibiotikan genom att de får gener som kodar för enzymer som förstör eller inaktiverar antibiotikan.
- Resistenta bakterier kan förhindra eller fördröja upptaget av antibiotika, detta genom att reducera kanaler i cellmembranet, så kallade poriner, som släpper igenom antibiotika.
- Receptorerna i bakteriens cellyta kan förändras så att läkemedlet inte binder till dem, eller så kan det binda men inte lika effektivt.
- Resistenta bakterier kan vara resistenta genom att pumpa ut läkemedlet ur cellen innan det hinner verka, vilket sker genom ett så kallat effluxsystem.

1.3 Naturprodukter och sekundära metaboliter

I tusentals år har naturprodukter, i hela världen, spelat en viktig roll för att behandla och förebygga olika sjukdomar (5). Naturprodukter härstammar från olika källmaterial såsom växter, markbundna mikroorganismer, marina organismer samt djur. Den vanligaste definitionen av naturprodukter är att de är "kemiska (kol)föreningar" isolerade från levande organismer. Dessa föreningar härrör ofta från sekundära metaboliter hos levande organismer. De småmolekylära sekundära metaboliterna från mikroorganismer utgör den viktigaste delen av naturprodukter, detta eftersom de ofta uppvisar biologiska aktiviteter (antimikrobiella, antitumöra, antivirala, farmakologiska och liknande aktiviteter) (5).

1.4 Aktinomycter

Aktinomycter är bakterier som i sällsynta fall kan orsaka infektioner hos människa. (6). Aktinomycter tillhör ordningen Actinomycetales som indelas i fyra familjer: Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae, Streptomycetaceae och Actinoplanaceae (7).

Aktinomycceter skiljer sig från andra bakterier genom att de har ett mycelieliknande växtsätt och växer långsamt (7). Aktinomycceter kan producera många olika bioaktiva metaboliter som är kända för deras antibakteriella, antifungala, antitumöra, antimalariala och antiinflammatoriska aktivitet (8). Dessa bakterier utgör den viktiga källan till antibiotika (8, 10).

Aktinomycceter kan anpassa sig till extrema förhållanden i jorden genom att bilda sporer som är tåliga mot torka, värme och kemikalier (5). Dessa bakterier har visat sig vara en rik källa för biologiskt aktiva naturprodukter, i synnerhet de bakterier som hör till släktet *Streptomyces* (9). Aktinobakterier varierar mycket fysiologiskt, vilket framgår av deras produktion av ett stort antal extracellulära enzymer samt genom att de syntetiserar och utsöndrar tusentals metaboliter (10).

1.5 Marina miljön

Efter fortsatt isolering av aktinomycceter blev jordmiljön utmattad och forskarna vände sig då mot andra källor. Den marina miljön som utgör mer än tre fjärdedelar av världens yta är ett överlägset alternativ. Det som är fördelaktigt med denna källa är att den är relativt outnyttjad och rik på unika antibiotiska egenskaper (11). Det har visat sig att många mikroorganismer såsom aktinomycceter tvättas bort från land eller blåses med luft ner i havet (12).

1.6 MRSA

MRSA är den term som används för bakteriegruppen *Staphylococcus aureus* som är resistent mot de antibiotika som vanligen används mot stafylokockinfektioner (13,15). Traditionellt stod MRSA för meticillin resistens och då indikerar termen MRSA till meticillinresistent *S. aureus*, men termen hänvisar alltmer till en multiläkemedelsresistent grupp. Sådana bakterier har ofta resistens mot många antibiotika som används traditionellt mot *S. aureus*; penicilliner och penicillinliknande antibiotika (betalaktamantibiotika) och därför står MRSA ibland för multiläkemedelsresistent *staphylococcus aureus* (17). Under detta arbete hänvisas MRSA till multiläkemedel *S. aureus*. MRSA är av typen gula stafylokocker som utgör den vanligaste orsaken till sårinfektioner (13, 14). MRSA har ett kraftigt försvar mot många olika sorters antibiotika. Mycket allvarliga infektioner kan förekomma när dessa organismer invaderar och växer i blodet och hjärtklaffarna och kan därför förknippas med hög dödlighet. Dessutom kan dessa bakterier vara en orsak till lunginflammation, hjärnhinneinflammation och infektioner i skelett och leder (14).

MRSA sprids genom direktkontakt och därför är det viktigt att vara noggrann med hygien för att undvika smittspridning (15). Det är också viktigt att infekterade sår sköts ordentligt, för att på så sätt förhindra ytterligare infektioner (15). Oftast läker MRSA-infektioner av sig själva, men ibland kan det behövas en behandling med antibiotika (13). I de flesta fallen då MRSA- bakterier har invaderat våra kroppar, tar immunförsvaret själv hand om dessa bakterier och oskadliggör dem utan någon medicinering (15). De MRSA-smittade har oftast inga symptom, utan är bara bärare av MRSA-bakterier på huden eller i näsan (15). MRSA har tidigare kallats för "sjukhussjuka" eftersom den har varit ett vårdrelaterat problem. Denna benämning

har emellertid under åren förändrats och numera associeras MRSA-infektioner oftast med smitta ute i samhället (14).

2. Syfte

Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka den biologiska aktiviteten hos de sekundära metaboliterna (testade föreningar) som härrör från marina aktinomycceter och utvärdera deras antimikrobiella aktivitet mot MRSA. Studien ska alltså undersöka om föreningar från marina aktinomycceter kan vara en bra källa till nya antibiotika som används mot MRSA.

3. Metod

Detta arbete är en litteraturstudie som baseras på en genomgång av sex forskningsartiklar. I dessa artiklar undersöks aktiviteten hos små sekundära metaboliter från marina aktinomycceter mot MRSA .

Artiklarna har sökts med hänsyn till kriterierna senast publicerade, relevanta frågeställningar och syfte. Materialsökning gjordes i databasen PubMed mellan 2013-04-03 och 2013-04-15. Ordkombinationer som används vid sökningen har bl.a. varit "marine actinomycceter and infection", "marine organism and new drugs", "marine environment" och "marine sediment and streptomycetes" med begränsningen "last five years". Även textsökning på internet via sökmotorn Google har gjorts för att hitta studier som säger emot syftet med texten "The negative effect of actinomyccetes" och "The weak activity of secondary metabolites derived from actinomyccetes".

4. Resultat

4.1 "Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*"

I tidskriften *The Journal of antibiotics (Tokyo)* beskrivs i en artikel av Nina M. Haste et al en utvärdering av det streptogramin antibiotikumet, etamycin som en ny upptäckt från marina aktinomycceter (11). Aktinomyccetstammen CNS-575 samlades och isolerades från marinsediment längs Fiji. Med hjälp av 16S ribosomal RNA-gensekvensanalys, placerades denna stam inom släktet *Streptomyces*.

Studien undersökte in vitro etamycins aktivitet mot två stammar av multiläkemedelsresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA), sjukhusassocierade (HA-MRSA) och samhällsassocierade (CA-MRSA). Dessutom testades etamycin mot andra Grampositiva samt några Gramnegativa patogener. Studien visade att etamycin har en gynnsam antibakteriell aktivitet och tid-dödande kinetik. In vivo (i en murin systemisk infektionsmodell) uppvisade denna förening en skyddande effekt mot testade MRSA-stammar.

Streptogramin antibiotikum, quinupristin-dalfopristin (Synercid®) är en kombination mellan streptogramin A (quinupristin) och B (dalfopristin). Detta antibiotikum är aktivt mot komplicerade hudinfektioner som orsakas av multiläkemedelsresistenta Grampositiva bakterier såsom MRSA. Etamycin tillsammans med streptogramin A isolerades från *Staphylococcus griseus*. Dessa två antibiotika visade synergieffekter med andra streptograminer. Studien avslöjade att etamycin uppvisade en signifikant aktivitet mot MRSA ensam men ej i kombination med streptogramin A (11).

Resistensundersökning

Odlingen av teststammen pelletterades och suspenderades i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) och sattes sedan i 96-brunnsplatta innehållande etamycinutspädningar. Testplattorna med etamycin och bakterierna inkuberades vid 37°C under 18-20 timmar. Vankomycin användes som kontroll för alla MRSA-stammar. Resultatet visade att den minsta inhiberande koncentrationen (MIC) varierade från 1-2 mg/L för CA-MRSA-stammar och vissa HA-MRSA-stammar, till 8-16 mg/L för HA-MRSA-stammar, ATCC 33591 och Sönger 252 (11)(tabell 1). Detta indikerar en god aktivitet hos etamycin mot CA-MRSA och Vissa HA-MRSA.

Tabell 1. Antimikrobiell aktivitet hos etamycin. Tabellen är en del av en tabell i referens 11.

HA- och CA-MRSA	MIC (mg/L)
UAMS-1 (USA200)	1-2
Sönger 252	8-16
NRS22 (USA600)	1-4
NRS119 (linezolid-resistant strain)	1-2
ATCC 33591	16
NRS192	2
NRS386 (USA700)	2
Icke MRSA-stammar	
<i>E. faecalis</i> (vanB)	16
<i>S. pyogenes</i> (M1 strain 5448)	8
<i>S. agalactiae</i> (serotype III strain COH1)	8
<i>H. influenzae</i> (type b, ATCC 10211)	16
<i>M. catarrhalis</i> (ATCC 25238)	1

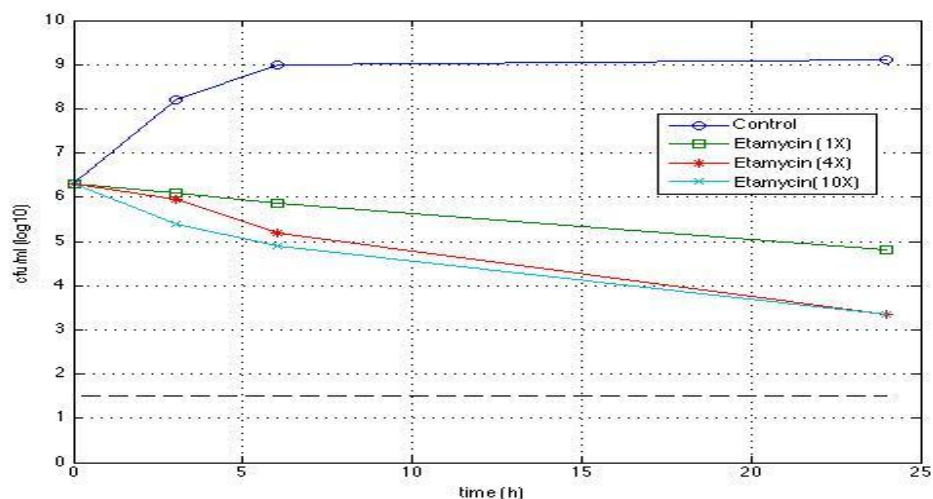
Siffrorna visar gynnsamma MIC-värden (mg/L) för etamycin mot CA- och vissa HA-MRSA i jämförelse med icke MRSA-stammar. Den minsta inhiberande koncentrationen MIC varierade om från 1-2 mg/L för CA-MRSA stammar och vissa HA-MRSA-stammar till 8-16 mg/L för HA-MRSA-stammar, ATCC 33591 och Sönger 252.

Terapeutiskt index

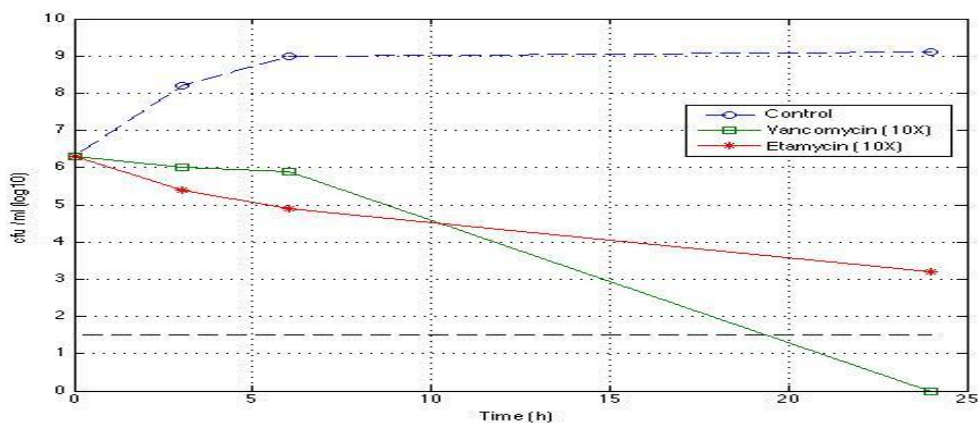
Analysering av terapeutiskt index hos etamycin har genomförts under denna studie. Cytotoxicitet testades på humana celler (Hela-celler) och resultatet uppvisade ingen cytotoxicitet vid koncentrationer upp till 128 mg/L, vilket indikerar ett gynnsamt terapeutiskt index mot MRSA.

In vitro tid-dödande kinetik

MRSA-stammen CNS-575 odlades och bakterierna framställdes i en fosfatbuffrad saltlösning (PBS). Bakterierna tillsattes sedan till teströren som innehöll etamycin, vankomycin eller kontroll vid olika koncentrationer (1x, 4x och 10x MIC) för varje förening. Båda antibiotika testades mot CA-MRSA (USA300) stam UAMS-1182. Vid 1x MIC visade etamycin en progressiv minskning i antalet överlevande bakterier (fig.1A), medan vid 10 × MIC uppvisade etamycin en något snabbare avdödningsaktivitet än vankomycin under de första 6 timmarna. Vankomycin kunde däremot minska antalet livskraftiga bakterier till under tröskelvärdet inom 24 timmar (fig.1B). Tid-dödande kinetik uppvisade en potent aktivitet hos etamycin som var snabbare i både tid och i koncentrationsberoende mekanismer än vankomycin. Å andra sidan uppvisade etamycin en begränsad baktericid effekt mot CA-MRSA.



Figur 1 A. Koncentrationsberoende avdödningsaktivitet hos etamycin mot CA-MRSA-stammen, USA300 under 24 timmar. Uppgifterna i figuren representerar medelvärden av tre olika försök vid 1x, 4x och 10x MIC ($\mu\text{g/ml}$). Det är en progressiv minskning i antalet överlevande bakterier vid 1x MIC ($\mu\text{g/ml}$). Figuren är modifierad från figur 2 i referens 11.

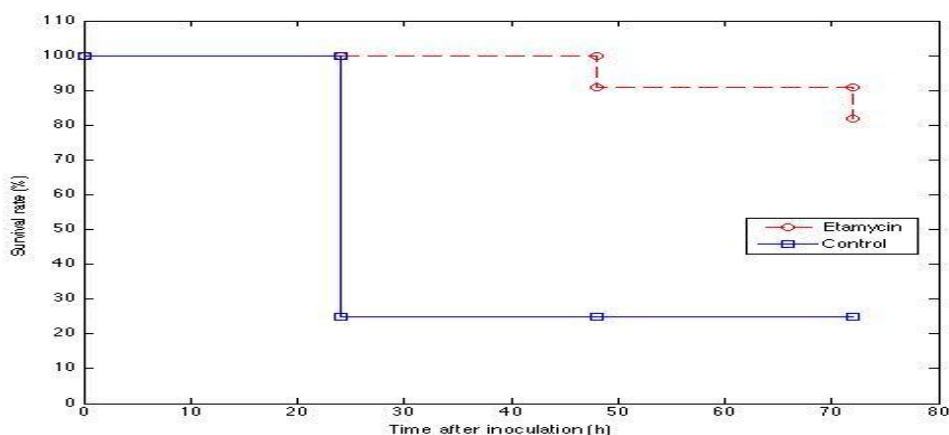


Figur 1 B. Figuren visar jämförelse mellan etamycin, vankomycin vid 10x MIC ($\mu\text{g/ml}$) med avseende på *in vitro* tid-dödande kinetik mot CA-MRSA-stammen, USA300. Under de första sex timmarna uppvisade etamycin en något snabbare avdödningsaktivitet än vankomycin mot MRSA-stammar. Vankomycin kunde däremot minska antalet överlevande bakterier till under tröskelvärdet (linjen vid 1,6 log10) inom 24 timmar. Figuren är modifierad från figur 2 i referens 11.

In vivo-analyser

För att bedöma *in vivo*-aktiviteten hos etamycin, infekterades systemiskt åtta veckor gamla möss ($n=10$) av MRSA-stam, Sanger 252. Mössen injicerades med 20 mg/kg etamycin och med motsvarande volym vehikel som kontroll ($n=8$) vid 1 och 8 timmar efter infektion. Uppföljning av hälsa och överlevnad har gjorts i upp till 72 timmar.

De flesta mössen i kontrollgruppen visade symptom av sepsis (letargi, uttorkning och piloerektion) inom 6 - 12 timmar efter MRSA-infektion, medan majoriteten av den etamycinbehandlade gruppen uppvisade en kraftig minskning i besvärlighetsgraden av dessa symptom eller så har de saknats. Resultatet visade att de två doserna av etamycin gav ett betydande skydd för MRSA-infekterade mössen under 72 timmar (fig.2).



Figur 2. Effektivitet hos etamycin i en murinmodell mot HA-MRSA. Åtta möss infekterades med Sanger 252 (cfu). Mössen injicerades med antingen 20 mg/kg etamycin eller motsvarande volym kontroll. Symptomen av sepsis har övervakades hos dessa möss i upp till 72 timmar. Ett betydande skydd gav etamycin till MRSA-infekterade möss under 72 timmar. Figuren är modifierad från figur 3 i referens 11.

4.2” Bactericidal Kinetics of Marine-Derived Napyradiomycins against Contemporary Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus”

I en studie från 2011 gör Nina M. Haste et al i tidskriften *Marine Drugs* en in vitro-kinetisk analys av de antibiotiska egenskaperna av två derivat av napyradiomycin mot MRSA-stammar (19). Aktinomyctstammen CNQ-525 isolerades från marinsediment som hade samlats från 152 m djup utanför La Jolla, i Kalifornien, USA. Med hjälp av en 16S rRNA-sekvensanalys identifierades denna stam som napyradiomycin och placerades inom familjen Streptomycetaceae. Två derivat av denna stam har identifierats och utvärderats under denna studie: napyradiomycin 1 och 2; A80915A respektive A80915B (fig. 3).

De antibiotiska egenskaperna av napyradiomycin mot vissa stammar av meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA) har utvärderats med avseende på minsta hämmande koncentration (MIC), tid-dödande kinetik och det strukturella aktivitetssambandet (SAR). Resultatet avslöjade att både napyradiomycin 1 och 2 uppvisade potenta anti-MRSA-aktiviteter mot CA- och HA-MRSA-stammar och mot vankomycinresistent *Staphylococcus aureus*, (VRSA) och en rad glykopeptidresistent *Staphylococcus aureus* (GISA).

Resisitensbestämning av MIC-värde

MIC-värdet för derivat 1 var ~ 2 µg/ml mot CA-MRSA-stammar, medan MIC för derivat 2 mot samma stammar uppvisade något mer potenta aktiviteter, ~1,5 µg/ml. Ett genomsnittligt MIC-värde av 1-3 µg/ml uppvisade både derivat 1 och 2 mot HA-MRSA-stammar (tabell 2).

Tabell 2. Minsta hämmande koncentration MIC (µg/ml) för båda napyradiomycin-derivaten mot HA och CA-MRSA-stammar. Tabellen är modifierad från en tabell i referens 16.

CA-MRSA-stammar	Derivat 1	Derivat 2
MRSAUSA300(UAMS1182)	1,5-3	1-3
MRSAUSA300(TCH1516)	2	1-2
HA-MRSA-stammar	Derivat 1	Derivat 2
MRSA-ATCC33591	1-2	2
NRS70 (N315)	1	2
Sanger 252	1-2	1
NRS100 (COL)	1	2
MRSA clinical bacteremia isolate c44	3	1,5
MRSA clinical bacteremia isolate c-88	1,5- 3	1,5

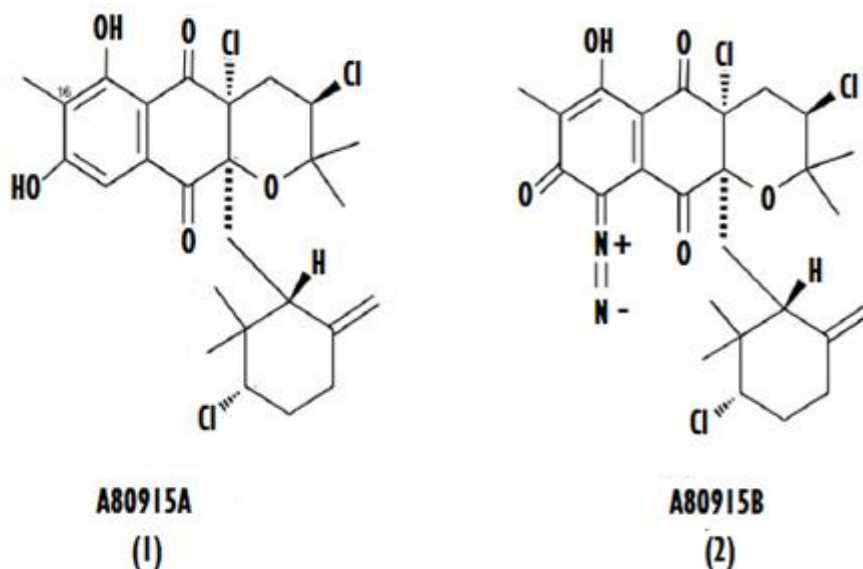
Uppgifterna i tabellen visar MIC-värde (µg/ml) för derivat 1 och 2 mot CA- och HA-stammar. MIC-värdena för derivat 1 och 2 är (~2 µg/ml) respektive (~1,5 µg/ml) mot CA-MRSA. MIC-värdet för båda napyradiomycinderivaten är 1-3 µg/ml mot HA-MRSA. Napyradiomycin uppvisade en potent aktivitet mot dessa stammar (16).

Toxicitet

Uppgifter om det strukturella aktivitetsambandet (SAR) är viktiga vid utveckling av nya antibiotika. Förekomsten av C16-metylgruppen kunde exempelvis reducera den cytotoxiska aktiviteten något hos derivat 1 (A80915A) i jämförelse med andra napyradiomycinderivat som saknar denna metylgrupp (16). Det som skiljer sig åt

mellan dessa två derivat är att derivat 2 har en diazoketon grupp som cellcytotoxicitet.

Toxiciteten av napyradiomycin 1 och 2 kvantifierades med hjälp av HCT-116 (Humana adenokarcinomceller i kolon). Båda derivaten uppvisade ett lågt terapeutiskt index. Den halva maximala hämmande koncentrationen (IC₅₀- värde) för napyradiomycin 1 var 3 µM och 500 nM för derivat 2. Detta resultat tyder på att derivat 2 uppvisade mer toxicitet än 1 vilket kan korreleras med förekomsten av en diazoketon grupp som ökade toxiciteten hos derivat 2 (16).

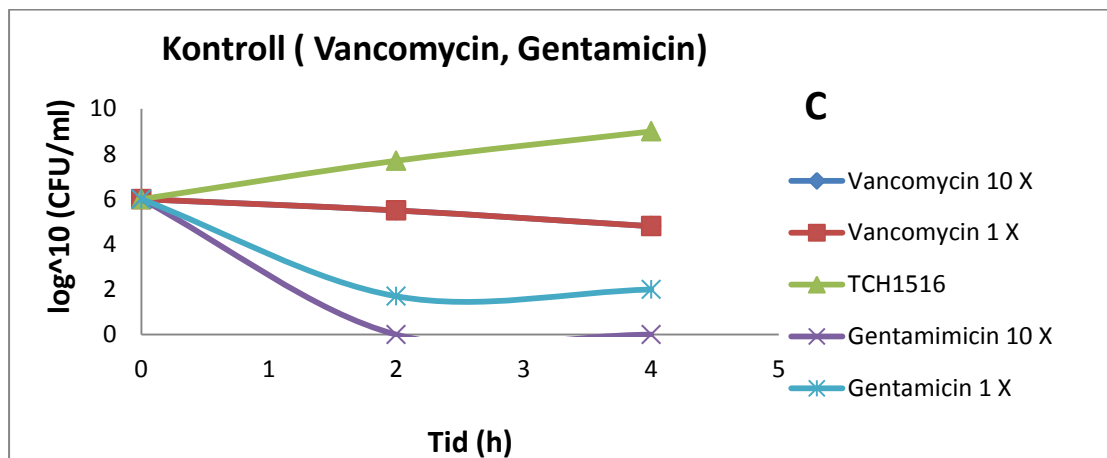
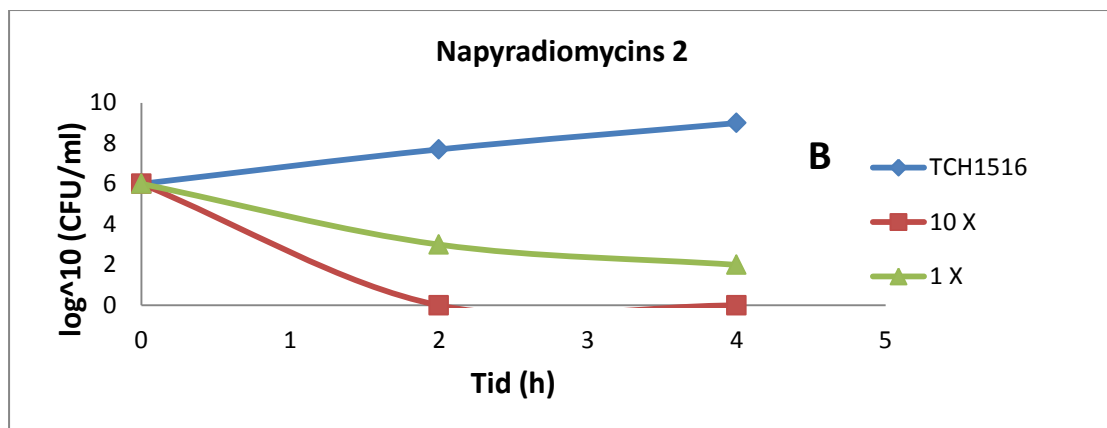
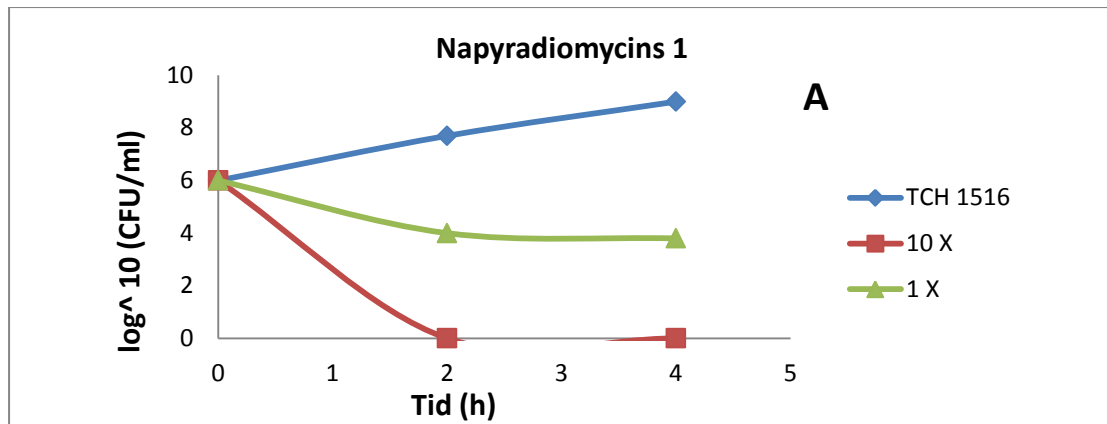


Figur 3. Strukturerna av två napyradiomycin 1 och 2. Strukturerna skiljer sig åt genom förekomsten av en diazoketongrupp som ökar cellcytotoxiciteten. I båda förekommer en metylgrupp vid C16-positionen vilket har befunnits reducera cytotoxiska aktiviteter. Figuren är modifierad från figur 1 i referens 16.

Tid- Dödande kinetik

Tid-dödande kinetik för derivat 1 och 2 har utvärderats under denna studie. Två olika koncentrationer 1x och 10x för varje derivat jämfördes med motsvarande koncentrationer av vankomycin eller gentamycin mot CA-MRSA USA300 (TCH1516) och HA-MRSA Sanger252. Vid 10x MIC uppvisade derivat 1, 2 och gentamycin en fullständig avdödningsaktivitet på bara två timmar (fig. 4, A, B och C).

Vid 1x MIC uppvisade derivat 1 en minskning med ungefär två-log i antalet bakterier på 4 timmar (fig. 4A), medan derivat 2 vid samma koncentration uppvisade en minskning med fyra-log i antalet bakterier på bara två timmar (Fig. 4.B). Detta tyder på att derivat 2 uppvisade en något mer potent och snabbare avdödningsaktivitet än den för derivat 1. Resultatet av denna analys visade att både derivat 1 och 2 har ett effektivt tid-dödande även vid 1x MIC.



Figur 4. In vitro tid-dödande analyser av derivat 1 (A), derivat 2 (B), och kontroll (C) mot CA-MRSA TCH1516. (A) Derivat 1 visade en två-log minskning i antalet bakterier (cfu/ml) på fyra timmar vid 1x MIC. (B) Vid 1x MIC visade derivat 2 en fyra-log minskning i antalet bakterier på två timmar. En fullständig avdödningsaktivitet hos derivat 1, 2 och gentamicin vid 10x MIC på två timmar (A, B och C). Figuren är modifierad från figur 2 i referens 16.

Aktivitet i närvaro av serum

Aktiviteten av dessa derivat testades också i närvaro av 20 % normalt humant serum mot CA-MRSA USA300, stammen TCH1516. Resultatet visade att aktiviteten hos båda derivaten av napyradiomycin upphör i närvaro av 20 % humant serum. Detta bör tas hänsyn till vid vidareutveckling av nya läkemedel av napyradiomycin för

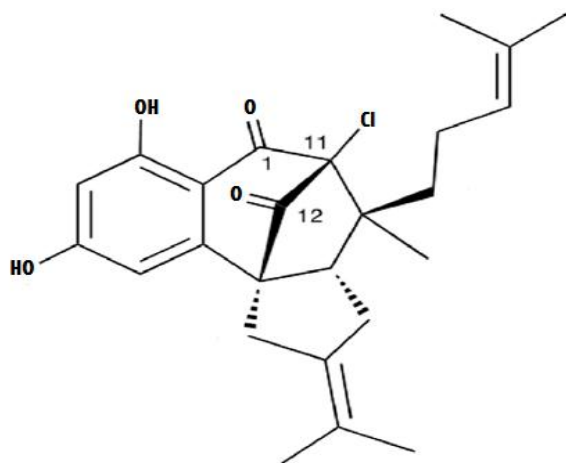
systemisk behandling. Alternativet är att dessa derivat ska begränsas till externa appliceringar (16).

Sammanfattningsvis visade denna studie att två olika derivat från napyradiomycin, 1 (A80915A) och 2 (A80915B), har utmärkta antibakteriella aktiviteter mot en rad MRSA-stammar. Studien har också påvisat en snabb avdödningsaktivitet hos dessa två derivat mot MRSA-stammar.

4.3 “Novel Bacterial Metabolite Merochlorin A Demonstrates *in vitro* Activity against Multi-Drug Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”

I tidskriften *PloS ONE*, 2012, beskriver George et al. en utvärdering av aktiviteten hos merochlorin A, ett isolat från marina aktinomyceter. Studien granskade *in vitro*-egenskaperna hos denna förening mot multiläkemedelsresistenta *S. aureus* (MRSA) och meticillinkänsliga *S. aureus* (MSSA) och andra Gram-positiva bakterier (17).

Aktinobakterier (stam CNH-189) samlades och isolerades från sediment utanför Oceanside, Kalifornien. Baserat på 16S rRNA-gensekvensanalyser identifierades denna stam som en ny art av streptomyceter. Med hjälp av en omfattande spektroskopisk analys som omfattade en tilldelning av molekylens struktur, visade strukturanvisningen att merochlorin A besitter ett nytt kolskelett som inte visades hos några andra antibakteriella medel (fig. 5).



Figur 5. Den kemiska strukturen av merochlorin A visar ett nytt kolskelett som inte kunde ses hos några andra antibakteriella medel. Placering av kloratom vid C-11 och anslutning av C-1 till C-11 och C-11 till C-12 är markerade i figuren. Figuren är modifierat från figur 1 i referens 17.

In vitro-resistensundersökning

Resistens känslighet hos merochlorin A och vankomycin mot MRSA ATCC33591 genomfördes på Mueller Hinton-buljong (MHB) och Mueller- Hinton agar (MHA). Färgförändringsindikatorn, resazurin användes som en signal om celltillväxt. En visuell utvärdering för färgförändring från den blå indikatorn till den rosa utfördes efter en två timmar lång inkubation vid 37°C vilket var ett tecken på bakteriell tillväxt. Resistens känsligheten bestämdes i frånvaro och i närvaro av 20 % humant serum.

Resistensundersökning i frånvaro av serum

MIC-värde bestämdes för merochlorin mot multiläkemedel Staphylococcus aureus stammar och visade 2 - 4 mg/L. Detta tyder på en potent aktivitet hos merochlorin A mot MRSA, MSSA, och vancomycin- resistent enterococcus faecalis(VRE) (tabell 6).

Tabell 6. Resistensundersökning av merochlorin A mot multiläkemedelsresistenta *S. aureus*-stammar. Tabellen är en del av en tabell i (17).

Stamnummer	Arter	Merochlorin A MIC (mg/L)
SA7817	MRSA	2
SA7819	MRSA	2
7819erm	MRSA	2
SA354	MRSA	2
SA355	MRSA	2
SA853	MRSA	2
A5937	MRSA	2
SA6300	MRSA	2
SA0616	MSSA	2
SA0701	MSSA	2
RN6607	MSSA	4
RN9120	MSSA	4
RN9120b	MSSA	4
SA6298	VISA	2
VRSA M	VRSA	2

Uppgifterna i tabellen visar MIC-värden (2-4 mg/ L) för merochlorin A mot testade MRSA- stammar. Merochlorin A uppvisar en potent aktivitet mot MRSA-stammar. Tabellen är modifierad från tabell 2 i referens 17.

Resistensbestämning i MHB innehållande serum

Merochlorin A testades in vitro för dess aktivitet i närvaro av serum. Undersökningen utfördes i Mueller-Hinton-agar (MHB) som innehöll 10 % och 20 % humant serum. Resultatet visade ett fullständigt upphörande av aktivitet (MIC-värde = 64 mg/L) hos testade stammar.

Tid-dödande kinetik

Avdödningsanalyser utfördes med linezolidresistenta MRSA och två vankomycinintermediat resistent Staphylococcus aureus (VISA) arter för att utvärdera avdödningstiden för merochlorin A mot dessa stammar. Odlingsmedierna

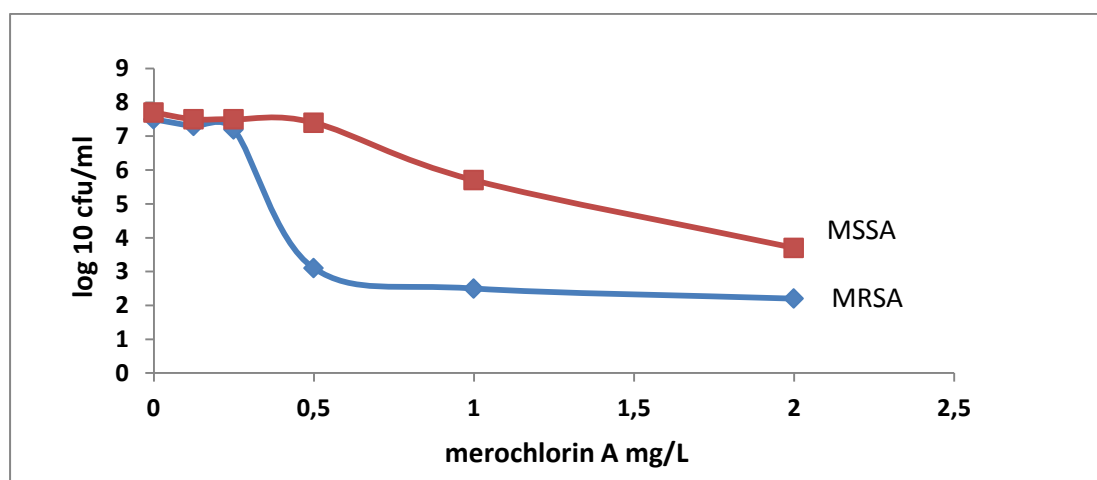
av teststammar späddes i färsk buljong som innehöll merochlorin A vid 46 MIC (8-16 mg/L), som därefter inkuberades vid 37°C. Kolonierna räknades för att beräkna överlevande (cfu/ml). Merochlorin A visade en potent baktericid aktivitet mot alla de testade stammarna och uppnådde detektionsgränsen på 24 timmar.

Post-antibiotisk effekt (PAE)

Ett inokulat av en MRSA ATCC33591 inkuberades under 1 timme i Mueller– Hinton-agar (MHB) innehållande 16x MIC merochlorin A vid 37°C. Bakterierna pelletades och återsuspenderades i en lika stor volym av en antibiotikafri MHB som kontroll. För att beräkna cfu/ml över tiden erhöles prover vid olika tidpunkter och kolonier räknades vid respektive tidpunkter. Resultatet avslöjade att vid 1x MIC uppvisade merochlorin A en postantibiotisk effekt i 8-9 timmar mot MRSA-stammen.

Populationsanalys

Ett inokulat av MRSA ATCC33591 och MSSA ATCC 29213 framställdes i MHB. Kolonier av dessa framställda bakterier ströks på MHA-plattor innehållande olika koncentrationer, 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, och 16 mg/L av merochlorin A. Överlevande bakterier räknades för varje koncentration. Resultatet visade betydligt högre livskraftiga bakterier för MSSA jämfört med MRSA vid 0,5 och 1 mg/L (fig. 6).



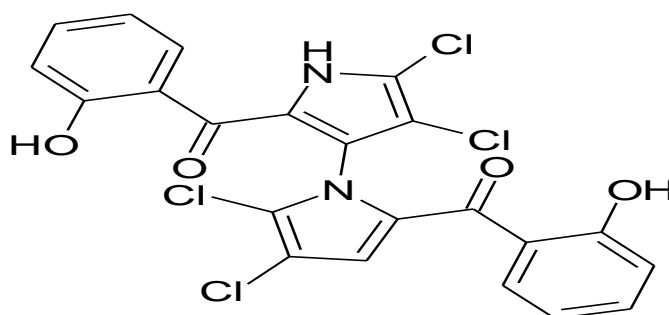
Figur 5. Populationsanalys av ATCC 29213 (MSSA) och ATCC 33591 (MRSA). Vid 0,5 och 1 mg/L visade merochlorin A ett betydligt större antal överlevande bakterier (cfu/ml) för MSSA jämfört med MRSA. Figuren är modifierad från figur 2 i referens 17.

Cytotoxicitetsanalys

För att utvärdera cytotoxiciteten testades merochlorin A på två däggdjursceller, HeLa och L929 i närvaro av minskande koncentrationer av merochlorin A. Under 24-timmars test var cytotoxiciteten gynnsam, 64 mg/L, i HeLa-cellerna men vid en längre tidstest (72 timmar) ökade cytotoxiciteten till koncentrationer som är nära det antimikrobiella intervallet (32 mg/L).

4.4 “Pharmacological Properties of the Marine Natural Product Marinopyrrole A against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”

I tidskriften *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011 beskrivs en studie om effekten av ett isolat från marina aktinomycceter, marinopyrrole A. Denna förening producerades genom odling av aktinomyccetstammen, CNQ-418 (18). I studien karakteriserades *in vitro*-aktiviteten hos marinopyrrole A mot olika multiläkemedelsresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA). Studien syftar till att visa ett nytt effektivt antibiotikum mot (MRSA) infektioner eftersom de har nått epidemiska proportioner i många länder (18). Effekten av marinopyrrole A testades också mot stammar av meticillinkänsliga *Staphylococcus aureus* (MSSA), glykopeptidresistenta intermediära *Staphylococcus aureus* (GISA) och två stammar av vankomycinresistenta *Staphylococcus aureus* (VRSA). För att utvärdera den mikrobiella aktiviteten hos marinopyrrole A testades den genom att utföra en undersökning av resistens (bestämning av MIC), tid-dödande kinetik, cytotoxicitet och postantibiotiskeffekt (PAE). Erhållna resultat jämfördes med vankomycin, och linezolid.



Figur.6 Kemisk struktur av marinopyrrole A. Figuren är modifierad från en figur i referens 18.

Cytotoxicitet

Föreningen testades för bedömning av dess cytotoxicitet mot två däggdjurscellinjer (HeLa-celler och L929 celler) i syfte att uppskatta ett terapeutiskt index hos marinopyrrole A. Det uppvisades ett gynnsamt terapeutiskt index med 50 % hämmande koncentrationer (IC₅₀).

In vitro-antimikrobiella aktiviteter

Mätning av den minsta inhibitoriska koncentrationen (MIC) av marinopyrrole A mot *S. aureus*-stammar var (0,188 till 1,5 µg/ml), lägre än för vankomycin eller linezolid (Tabell7). Detta uppvisar en potent aktivitet hos marinopyrrole A mot testade MRSA-stammar (18).

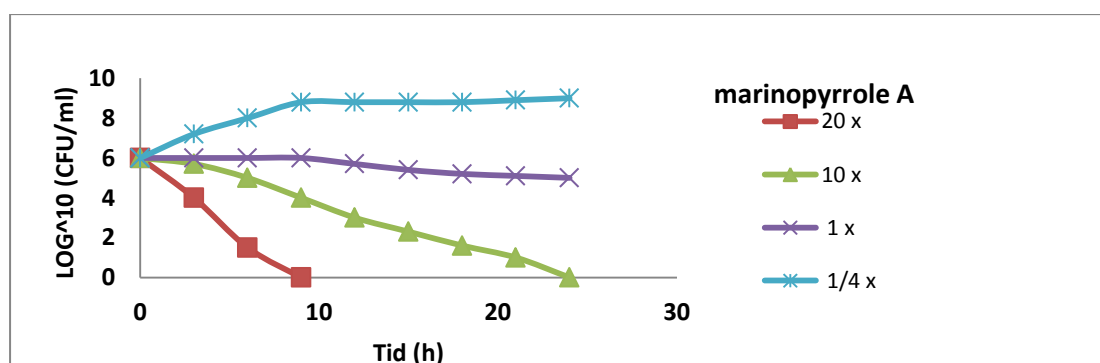
Tabell 7. *In vitro*-aktiviteter MIC ($\mu\text{g/ml}$) hos marinopyrrole A jämfört med vankomycin och linezolid mot testade MRSA-stammar. Tabellen är en del av en tabell i referens (18).

Staphylococcus aureus stammar	Klassifikation	Marinopyrrole A MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Vankomycin MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Linezolid MIC ($\mu\text{g/ml}$)
ATTCC 29213	MISSA	0,5-1	1-2	Ej tillämplig
UAMSI (USA200)	MSSA	0,75	1,5	Ej tillämplig
TCH1516(300)	CA-MRSA	0,188-0,375	2	3
UAMS11828USA300)	CA-MRSA	0,188-0,375	1,56	3
NRS386 (USA700)	CA/HA- MRSA	0,375	2-4	3
Sanger 252	HA-MRSA	0,375	1-2	3
MRSA ATCC 33591	HA-MRSA	0,188-0,375	1,56	Ej tillämplig
VRSA (Michigan)	VRSA	0,375-1,5	>256	Ej tillämplig
VRSA (Pennsylvania)	VRSA	0,375-1	>256	Ej tillämplig
A5940 α	Hetero-GISA	0,25-0,5	4	Ej tillämplig
PC-3 (New York)	VISA	0,25-0,5	8	Ej tillämplig
HIP5836 (New Jersey)	VISA	0,25-0,5	4-8	Ej tillämplig

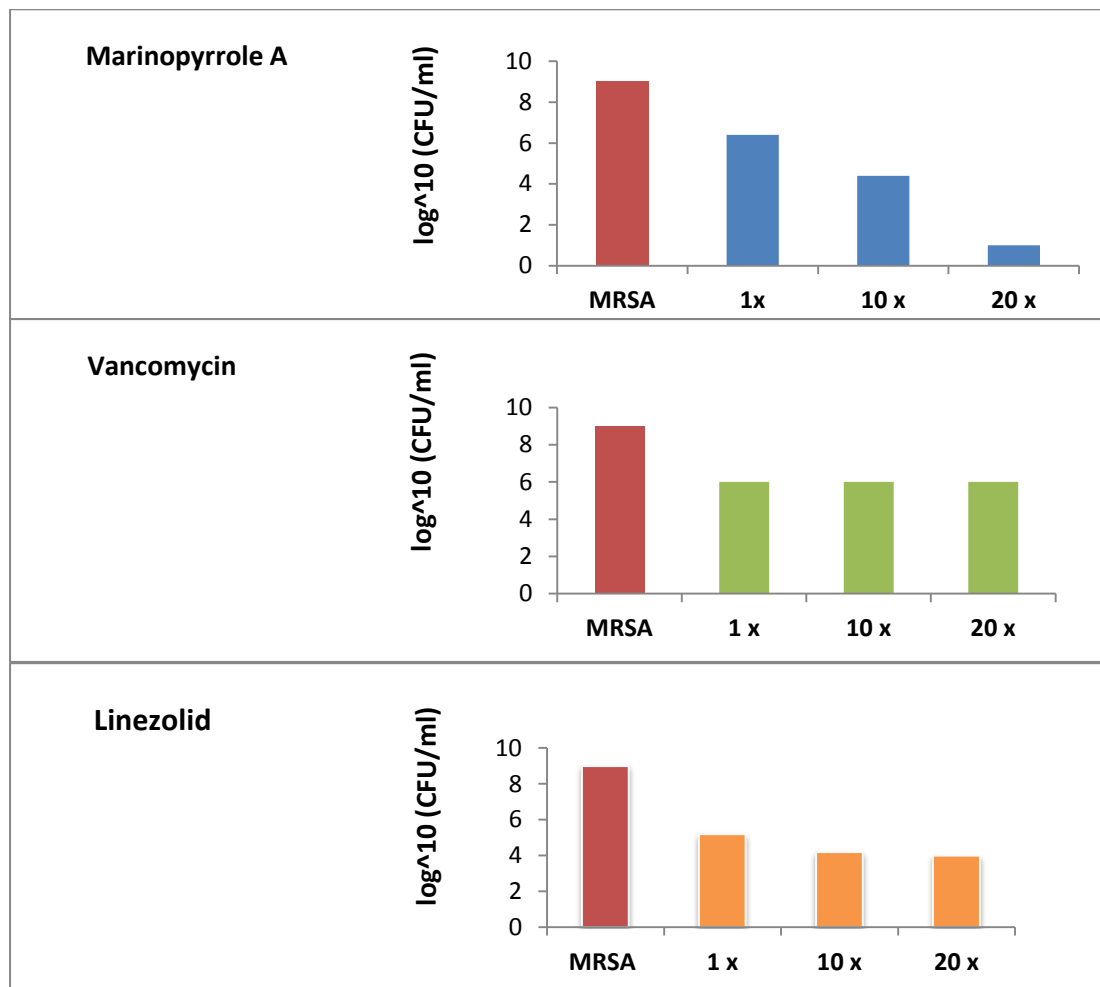
Uppgifterna i tabellen representerar MIC-värden ($\mu\text{g/ml}$) för marinopyrrole A, vankomycin och linezolid mot MRSA-stammar. MIC för marinopyrrole A (0,188-1,5 $\mu\text{g/ml}$) var lägre än för vankomycin och linezolid.

In vitro tid-dödande studier

Det har visats sig att avdödningsaktiviteter hos marinopyrrole A mot den testade MRSA-stammen TCH1516 är beroende av koncentrationen av marinopyrrole A. Vid 10x MIC visade marinopyrrole A en två- log minskning i antalet bakterier (cfu/ml) inom 9 timmar, medan vid 20x MIC var minskningen sex-log i antalet bakterier inom samma tid (fig. 7 A). Avdödningsaktiviteter hos marinopyrrole A jämfördes med lika förhållanden för vankomycin och linezolid och visades vara snabbare hos marinopyrrole A och vara beroende av koncentrationen (fig. 7 B). Resultatet visade att denna förening är helt beroende av koncentrationen i jämförelse med de andra testade antibiotika.



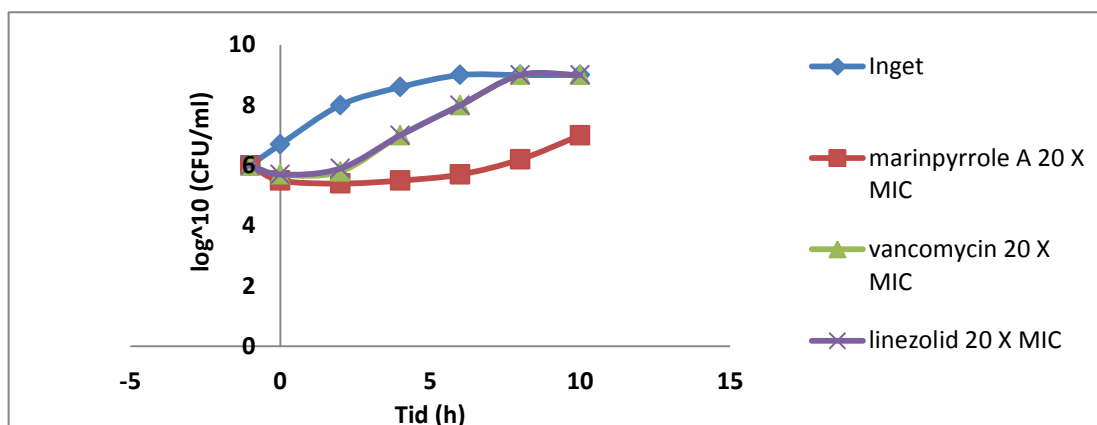
Figur 7A. Koncentrationsberoende avdödningsaktiviteter (cfu/ml) av marinopyrrole A. En snabb avdödningstid vid 20x MIC ($\mu\text{g/ml}$). Figuren är modifierad från en figur i referens 18.



Figur 7B. Tid-dödande aktivitet hos marinopyrrole A mot MRSA-stammar i jämförelse med vankomycin och linezolid. Figuren visar att avdödningsaktivitet (antalet bakterier som kvar efter sex timmar cfu/ml) är beroende av koncentrationen av marinopyrrole A och var snabbare än den hos vankomycin eller linezolid. Figuren är modifierad från en figur i referens 18.

Postantibiotisk effekt (PAE)

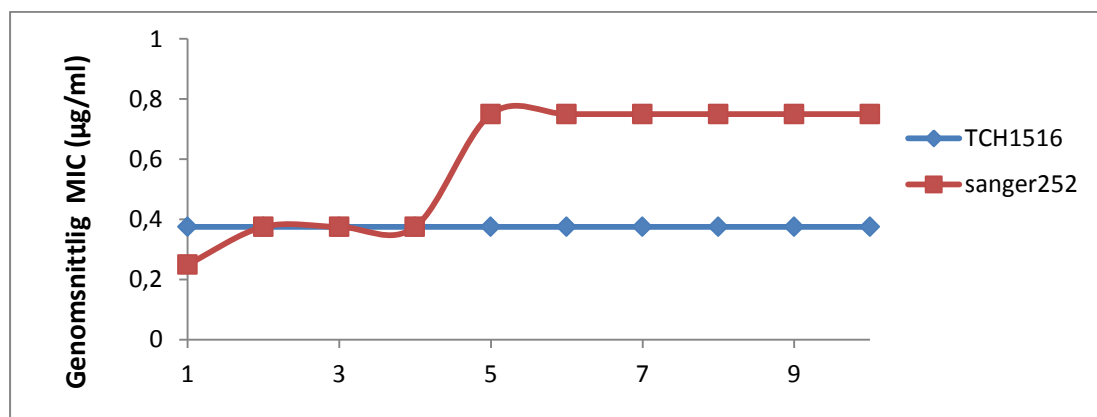
För att undersöka PAE av marinopyrrole A inkuberades MRSA-stammen TCH1516 under en timme vid 37°C med marinopyrrole A, vankomycin och linezolid vid 20x, 10x och 1x MIC. Därefter avlägsnades dessa antibiotika för att låta bakterierna återhämta sig i ett antibiotika-fritt medium. Marinopyrrole A uppvisade en koncentrationsberoende PAE. Vid jämförelse av marinopyrrole A med vankomycin och linezolid (20x MIC för varje antibiotikum) visades det att odlingen som behandlade med marinopyrrole A uppvisade en betydligt längre återhämtning med beräknade PAE mellan 4 och 6 timmar (fig. 8). Samma resultat erhöles vid jämförelse av marinopyrrole A med dessa antibiotika vid 10x MIC. Detta tyder på en betydlig gynnsammare PAE jämförd med Vankomycin eller linezolid.



Figur 8. PAE av maritopyrrole A i jämförelse med vankomycin och linezolid vid 20x MIC ($\mu\text{g/ml}$) för varje antibiotikum mot MRSA-stammen TCH1516. Figuren visar en längre återhämtning av bakterierna (cfu/ml) mot maritopyrrole A i jämförelse med vankomycin eller linezolid. Figuren är modifierad från en figur i referens 18.

Resistensbestämning vid en seriepassage experiment

Två av MRSA-stammar, CA-MRSA USA300 TCH1516 och HA-MRSA Sanger 252, inkuberades med olika koncentrationer av maritopyrrole A för att bedöma benägenheten hos dessa stammar att utveckla resistens mot maritopyrrole A under loppet av 10 dagar. Resultatet visade oförändrade MIC för CA-MRSA USA300 TCH1516 med MIC = $0.375\mu\text{g/ml}$ under en 10-dagarsperiod, medan den genomsnittliga MIC för HA-MRSA Sanger 252 endast ökade tvåfaldigt till $0,75\mu\text{g/ml}$. Härigenom uppvisade maritopyrrole A potenta hämmande aktiviteter trots upprepade bakteriell passage i sub-MIC-doser av föreningen (fig. 9).



Figur 9. Seriepassage av två MRSA-stammar, HA-MRSA Sanger 252 och CA-MRSA TCH1516 i sub-MIC av maritopyrrole A under loppet av 10 dagar. Figuren visar ingen förändring i MIC ($\mu\text{g/ml}$) för TCH1516, medan MIC för Sanger 252 endast ökade tvåfaldigt.

Aktiviteten i närvaro av humant serum

Undersökning av aktiviteten vid närvaro av normalt humant serum är viktig för att bestämma potentialen att använda marinopyrrole A för en systemisk behandling. Resultaten visade en kraftig minskning av aktivitet hos marinopyrrole A i närvaro av 20 % humant serum med MIC av $\sim 96 \mu\text{g/ml}$. Detta tyder på en hög grad av proteinbindning, vilket förhindrar dess användning som en systemisk behandling (tabell 8).

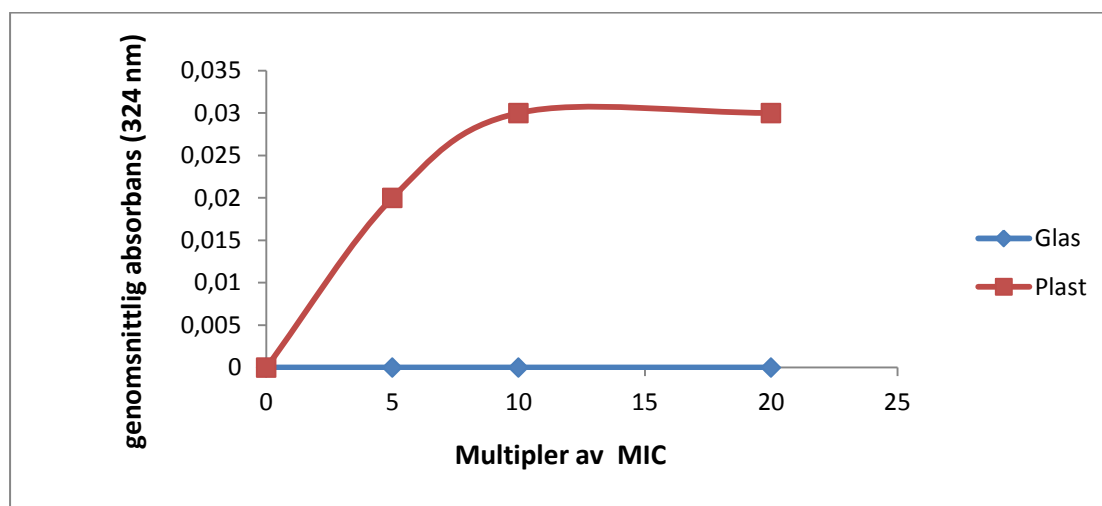
Tabell 8. *In vitro* MIC ($\mu\text{g/ml}$) av marinopyrrole A mot CA-MRSA (TCH116) i frånvaro och närvaro av serum. Tabellen är en del av en tabell i referens 18.

Testade förening	0 % serum	20 % serum
Marinopyrrole A	0,188-0,375	≥ 96

Uppgifterna representerar MIC-värden för marinopyrrole A i frånvaro av serum (0,188–0,375 $\mu\text{g/ml}$) och i närvaro av 20 % serum ($\sim 96 \mu\text{g/ml}$). En kraftig minskad aktivitet i närvaro av serum påvisas.

Adsorption till plast

Marinopyrrole A undersöktes med avseende på vad som kallas sorption, ett fenomen som kan uppstå när en förening som initialt adsorberas och sedan absorberas av sitt plastkärl (18). För att mäta förlusten av marinopyrrole A till plaströr i jämförelse med glaströr inkuberades plastprovrör och glaströr med ökande koncentrationer av marinopyrrole A under 22 timmar. Sedan användes metanolextraktion för att avlägsna den mängd som eventuellt adsorberats. Resultatet visade att vid ökade koncentrationer från 1 till 2, 5, och 10 gånger MIC adsorberades mängden av marinopyrrole linjärt. När koncentrationerna ökades till mer än 10 MIC, når adsorptionen (plateau) mättnad (fig. 10). Detta tyder på att marinopyrrole A adsorberar till plast, men inte till glas.



Figur 10. Tendens hos marinopyrrole A att adsorbera till plast. Genomsnittliga absorbanser (324 nm) genom plasten ökade linjärt vid ökade multipler av MIC ($\mu\text{g/ml}$). Adsorptionen når mättnad vid koncentrationer som är mer än 10 MIC. Figuren visar en högre tendens hos marinopyrrole A att adsorberas till plast. Figuren är modifierad från en figur i referens 18.

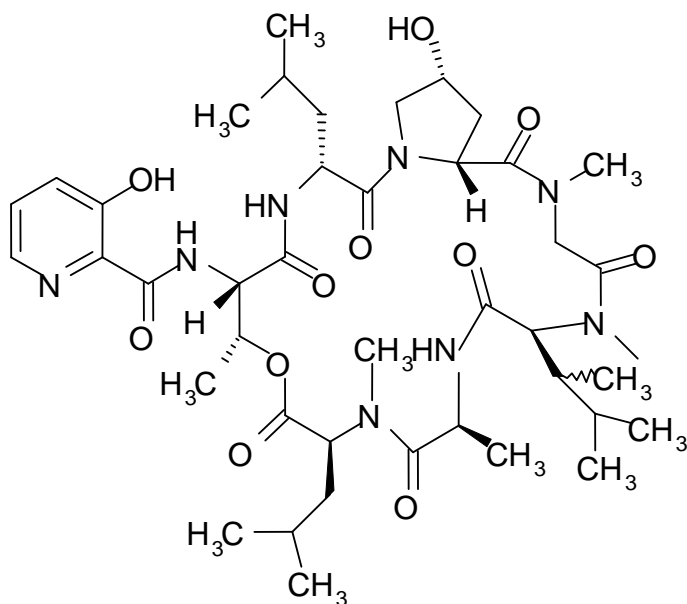
4.5 “Fijimycins A–C, three antibacterial etamycin-class depsipeptides from a marine-derived *Streptomyces* sp.”

I tidskriften *Bioorganic & medicinal- chemistry* från 2011 beskrivs i en artikel av Peng Sun et al. en undersökning om tre nya depsipeptider A-C som är medlemmar i klassen etamycin som härstammar från aktinomyceter. Studien granskar närmare de antibiotiska aktiviteterna hos fijimycin A-C och etamycin A (19). Prover av mikroorganismer samlades från öarna i Fiji på ett djup av ca 0,5 m och isolerades från stammen CNS-575. Baserat på 16S rDNA sekvensanalys identifierades denna stam som en art av *Streptomyces*.

- Fijimycin A erhöles som ett vitt, amorft fast material. Den molekylformel som bestämdes var C₄₄H₆₂N₈O₁₁.
- Fijimycin B är ett vitt, amorft fast ämne. Denna förening bestämdes ha molekylformeln C₄₂H₆₆N₈O₁₁.
- Fijimycin C, isolerades som ett amorft vitt pulver och tilldelades molekylformeln C₄₄H₆₂N₈O₁₂.
- Etamycin A är en viktig medlem i streptograminer (en klass av antibiotika), grupp B. Den är också kallad för virifogrisein I. Etamycin A isolerades först från markbundna *Streptomyces*, år 1954. Den uppvisade en signifikant aktivitet mot Grampositiva bakterier såsom *Mycobacterium tuberculosis*.

In vitro undersökning av antibiotiska aktiviteter hos fijimycins A-C

För att utvärdera den antibiotiska aktiviteten testades *in vitro*-aktiviteten hos fijimycin mot den sjukhusassocierade stammen (HA-MRSA) (ATCC33591), den sekvenserade sjukhusassocierade stammen (Sånger 252) och den samhällsassocierade stammen (CA-MRSA) (UAMS1182). Resultatet tyder på att fijimycin A, B, C samt etamycin A uppvisade starka aktiviteter (4-32 µg/ml) mot testade MRSA-stammar. Däremot uppvisade fijimycin B en svag aktivitet (>32µg/ml) mot både ATCC33591 och UAMS1182 (tabell 8). Detta berodde på brist av α-phenylsarcosine (PhSar) i strukturen av fijimycin B vilket skiljer sig åt från A och B (fig. 11) (19). I denna studie användes MIC 100 för att representera den minsta koncentrationen av fijimycin som kan ge en hundra procent inhibering av bakteriernas tillväxt.



Figur 11. Kemisk struktur av fijimycin B. Strukturen saknar α -fenyl sarkosin.

Tabell 8. Antibiotiska aktiviteter (MIC_{100} , $\mu g/ml$) hos fijimycin A, B, C och etamycin A mot testade MRSA-stammar. Tabellen är en del av en tabell från referens 19.

Förening	ATCC33591	Sanger 252	UAMS1182
Fijimycin A	16	32	4
Fijimycin B	>32	Inte gjort	>32
Fijimycin C	32	Inte gjort	8
Etamycin A	16	16	4

Uppgifterna representerar den lägsta läkemedelskoncentrationen som inhiberar 100 % av bakterietillväxten. Fijimycin A, C samt etamycin A uppvisar starka aktiviteter mot testade MRSA-stammar. Fijimycin B uppvisar en svag effekt mot både ATCC33591 och UAMS1182.

4.6 “*In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance Staphylococcus aureus*”

I en studie av Sathish Kumar et al från 2012, undersöktes aktiviteten hos ett isolat från marina aktinobakterier, SRB25, mot läkemedelsmultiresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA) (20).

Identifiering av Actinobacteria

Stammen SRB25 karakteriserades genom morfologiska och biokemiska metoder. Resultatet avslöjade att denna stam innehöll glycin i sin cellvägg vilket visade att stammen SRB25 tillhör släktet *Streptomyces*. De fysiologiska egenskaperna av stammen SRB25 uppvisade mer likhet vid jämförelse med *Streptomyces parvulus* och därför identifierades denna stam som *S. parvulus*.

Undersökning av de dagliga antibiotika som används mot MRSA

Den antibiotiska aktiviteten hos de vanliga antibiotika, inklusive ampicillin, meticillin, vankomycin och penicillin testades mot multiläkemedelsresistent *S. aureus* (MRSA) för att utvärdera känsligheten hos MRSA mot dessa antibiotika. Undersökningen genomfördes med hjälp av skivdiffusionsmetoden på Mueller-Hinton-agar (MHA). Isolatet av testpatogener odlades på (MHA)-plattor och skivor från dessa antibiotika placerades på agarytan. Plattorna inkuberades vid 37°C i 24 timmar. Resultatvärdena visade att de testade antibiotika inte visade någon inhiberingszon mot *S. aureus*.

Antibakteriell aktivitet hos stammen SRB25

Jordprover hämtades från saltddammar nära kustområdet i Kothapattanam, Indien. Baserat på kolonimorfologin och det mikroskopiska utseendet isolerades totalt 51 kolonier av aktinobakterier. Isolat av stammarna betecknades som SRB1-SRB51. De 51 isolaten screenades för deras antimikrobiella aktivitet och resultatet visade att bara fem isolat (SRB1, SRB 20, SRB 25, SRB32, SRB 38) uppvisade aktivitet mot MRSA .

Dessa isolat screenades primärt med hjälp av korsstrykningsmetoden på näringsmodifierade agarplattor (MNA) och plattorna inkuberades under sju dagar. MRSA-stammar korsströks på plattorna och inkuberades vid 37°C under 24 timmar. Plattorna observerades för inhiberingszon av testpatogener. MIC- värden bestämdes för dessa isolat och visade att SRB25 uppvisar en god antimikrobiell aktivitet mot MRSA (tabell 9) och därigenom valdes den ut för den sekundära screeningen.

Tabell 9. Primär screening mot MRSA. Tabellen är modifierad från tabell 2 i referens 20.

Organism	SRB 1	SRB 20	SRB 25	SRB 32	SRB 38
MDRSA	6,4±0,25	5,1±0,4	18,16±0,35	4,7±0,4	6,2±0,3

Uppgifterna representerar inhiberingszon (mm) av bakteriernas tillväxt efter den primära screeningen. SRB 25 visade en maximal inhiberingszon.

En extraktionsmetod har använts i denna undersökning för utvinningen av de bioaktiva metaboliterna från skördade medierna. De lösningsmedelsextrakt som har använts var etylacetatextrakt, butanolextrakt, kloroformextrakt och råextrakt. Dessa lösningsmedelsextrakt koncentrerades i syfte att användas för att undersöka antimikrobiell aktivitet hos denna stam.

En sekundär screening utfördes på Mueller-Hinton-agar (MHA). MRSA- stammar ympades i Mueller-Hinton-buljong MHB under 24 timmar vid 37°C. Därefter ympades testorganismerna på MHA-plattor genom steriliserade bomullspinnar. Med hjälp av en steriliserad gelborr utformades brunnar i dessa plattor. Lösningsmedelsextrakt fylldes i dessa brunnar och inkuberades vid 37°C under 24 timmar. Plattorna har observerats efter inkuberingen med avseende på förekomsten av inhiberingszon runt brunnarna.

Lösningsextraktet koncentrerades och användes sedan för att testa den mikrobiella aktiviteten mot MRSA-stammen. Bland lösningsmedelextrakten uppvisade etylacetatextrakt en potent aktivitet mot testorganismen till skillnad från andra lösningsmedelsextrakt som inte visade någon aktivitet.

Stammen SRB25 uppvisade en maximal inhiberingszon (tabell 10). MIC- värde för detta extrakt har bestämts och visade 1000 µg/ml.

Tabell 10. Sekundär screening av isolat SRB-25 mot MRSA- stammar. Tabellen är en del av tabell 3 i referens 20.

	Zon av inhibering (mm)			
	Råextrakt	Etylacetatextrakt	Butanolextract	Kloroformextrakt
MRSA	23,33 ±1,15	24,66±0,57	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet

Värdena i tabellen belyser att etylacetatextraktet uppvisade en maximal inhiberingszon.

5. Diskussion

Den snabba ökningen av HA- och CA-MRSA-infektioner i världen har föranlett forskarna till att söka efter nya antibiotika (16, 18). De flesta antibiotika som används idag mot resistent bakterier (MRSA) härstammar från markbundna aktinomycter (16). Som alternativ har forskarna riktat sitt intresse mot havet, som är en riklig källa till biologisk och genetisk variation av mikroorganismer som producerar nya biologiska metaboliter (11,18).

Grunden för mitt arbete är att undersöka om marina aktinomycter är en lovande källa för nya antibiotika mot MRSA. Alla studier som jag hittade stödjer syftet med mitt arbete. De forskningsartiklar som jag refererar till i mitt arbete påvisar aktiviteter hos små molekyler som härrör från olika stammar av aktinomycter mot MRSA-stammar. Sediment innehållande aktinomycter samlades i dessa undersökningar in från olika ställen och isolerades från olika stammar. Alla isolerade stammar hör till familjen Streptomycetaceae.

Studierna som har presenterats i detta arbete använde olika metoder för att uppvisa biologiska aktiviteter hos de föreningar som härrör från aktinobakterier mot MRSA och andra Grampositiva och Gramnegativa bakterier. De mest använda analyserna var resistensundersökning med bestämning av MIC-värden och in vitro tid-dödande kinetik.

Studien som utvärderade aktiviteten hos etamycin som isolerades från stammen CNS575 mot MRSA-stammar uppvisade en god aktivitet hos etamycin mot MRSA (11) . Denna förening undersöktes in vitro med avseende på tid-dödande kinetik, cytotoxicitet och resistensbesämning. Det som var intressant och unikt med denna studie är att författarna använde in vivo-analys. Denna analys innebär att ett experiment utförs i en hel, levande organism för att undersöka de farmakokinetiska och farmakodynamiska egenskaperna hos nya substanser (21). Enligt studien har de flesta mössen i den etamycinbehandlande gruppen avsaknade eller minskade

symptom av sepsis, men det finns ingen förklaring till varför de resterande mössen i denna grupp inte svarade på etamycinbehandlingen. Det skulle ha varit bättre om det hade angetts möjliga orsaker till varför etamycin inte gav en skyddande effekt till dessa möss. Hade de exempelvis en annan sjukdom som påverkade resultatet? Dessutom vet man inte om de möss som svarade på behandlingen fick några biverkningar. Vad händer om de tar högre doser av etamycin? Alla dessa frågor och många fler bör helst besvaras innan föreningen introduceras i sjukvården. Det är bättre om antalet undersökta möss ökar så att möjliga felaktiga resultat minskar.

I studien av Nine N. Haste et al har en utvärdering rapporterats av två tidigare beskrivna napyradiomycin, derivat 1 och 2. Uppgifter om SAR är viktig vid design av ett nytt derivat som antibiotikum (16). Dessa uppgifter avslöjade att förekomsten av C16-metylgruppen i derivat 1 och 2 kunde reducera cytotoxiciteten (fig.3)(16). Men trots denna strukturegenskap som skiljer de två derivaten från andra napyradiomycinderivat, uppvisade denna studie ett smalt terapeutiskt index för båda derivaten. Ett lågt terapeutiskt index innebär att doserna behöver övervakas så att de inte ger en toxisk effekt vilket utgör en nackdel som räknas till läkemedlet. Dessutom ökade diazoketongruppen ytterligare cytotoxicitet i däggdjursceller hos derivat två (fig.3)(16) vilket kan vara en annan orsak bakom ett minskat terapeutiskt index för derivat 2. Jag tror att napyradiomycinets båda derivat kräver mer signifikanta SAR-studier, exempelvis genom att göra en kemisk modifiering för att ännu mer minska ned på de cytotoxiska aktiviteterna och öka de biologiska aktiviteterna mot MRSA. Aktiviteter hos dessa föreningar bör också förbättras i närvaro av ett humant serum vilket kräver fler undersökningar och mer forskning.

Studien av George Sakoulas et al. (17) har utvärderat merochlorin aktivitet mot MRSA-stammar. Merochlorin isolerades från stammen CNH-189 och identifierades som en art av *Streptomyces*. Denna förening visade gynnsamma resultat när den testades in vitro, men däremot uppvisades en fullständig inaktivering i närvaro av 20 % humant serum som erhöles från en grupp friska donatorserum (17). Vid undersökning av aktivitet hos ett antibiotikum i humant serum tillsätter man albumin i fysiologiska koncentrationer till testmedierna eftersom de flesta antibiotika har en tendens till att främst binda sig till albumin (22). Det finns dock evidens på att vissa antibiotika kan binda till andra proteiner än albumin som bl.a. transferrin och laktoferrin (22). Detta innebär att MHB innehållande albumin vid fysiologiska koncentrationer inte alltid kan ge en tydlig bild av proteinbindning av ett antibiotikum (22). Detta bör tas upp vid vidareutveckling av nya antibiotika.

Marinopyrrole A som beskrivs i ytterligare en studie (18), undersöktes in vitro för sin mikrobiella aktivitet mot MRSA-stammar och andra Grampositiva bakterier. Undersökningen inkluderade också adsorptionskapacitet till plast hos marinopyrrole A samt inaktivering i närvaro av serum. Trots att dessa undersökningar uppvisade en potent antimikrobiell aktivitet hos marinopyrrole A, har det också visats sig en brist i den farmakologiska profilen (18). Aktiviteten av denna förening upphörde vid närvaro av 20 % humant serum vilket sannolikt kommer att förhindra att detta antibiotikum används för systemisk behandling. Däremot skulle det kunna användas lokalt och som utvärtes medel i stället. Anledningen till den hämmande aktiviteten i närvaro av humant serum är egenskapen hos detta antibiotikum som kallas för

proteinbindning. Den del av ett antibiotikum som är fri (den protein- obundna delen) penetrerar sig ut ur extracellulärt och där inträffar majoriteten av bakterieinfektionerna(22). Det är därför viktigt att bibehålla fria fraktioner (protein-obundna) av antibiotika i plasman genom att förhindra bindningen av detta antibiotikum till serum.

Å andra sida kan denna egenskap vara fördelaktig. Seruminaktivering skulle begränsa potentialen för systemisk toxicitet och säkerställa en långtidseffekt (18,22). Grunden till detta är att den bundna delen av läkemedlet kan användas som en källa eller som en depå och frisätta läkemedlet långsamt (22). När den obundna delen av läkemedlet metaboliseras eller utsöndras från kroppen kommer den bundna delen att släppas för att upprätthålla balansen. På det här sättet förlängs halveringstiden och därmed kan en långtidseffekt erhållas (22).

Studien av Peng Sun et al (19) och studien av P. Sathish Kumar et al. (20) uppvisade in vitro starka aktiviteter hos fijimycin A-C och etamycin A respektive SRB25 mot testade stammar. Trots de signifikanta antibakteriella aktiviteterna som uppvisades i dessa studier finns det brister i deras farmakologiska profil. Omfattande analyser skulle behöva göras såsom tidsberoende kinetik, inaktivering i serum, cytotoxicitet och om möjligt in vivo-analys för att säkerställa en säker effekt.

6. Slutsats

Sammanfattningsvis kan sägas att föreningar som isolerades från stammar av marina aktinomyccer kan vara en bra källa till nya antibiotika som används mot MRSA-infektioner. Föreningar som isolerades från marina aktinomyccer och testades i dessa studier uppvisade gynnsamma MIC- värden vid resistensundersökning mot MRSA- stammar. Dessutom uppvisade de föreningar som testades för sin dödande kinetik, en snabb avdödningsaktivitet mot MRSA. Vid resistensundersökning i närvaro av humant serum uppvisade de testade föreningarna ett fullständigt upphörande av aktivitet mot MRSA. Det krävs dock ytterligare forskning såsom kemiska modifieringar för att förbättra aktiviteten hos dessa föreningar i närvaro av serum så att de på ett säkert sätt ska kunna användas systemiskt.

7. Tackord

Ett stort tack till min handledare Per-Anders Enqvist för hjälpen under hela arbetet. Jag vill tacka också min studentkamrat, Gulala som uppmuntrade mig under arbetet.

8. Referenser

1. Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006, 70 (5):1060-75.
2. Bauman R. *Microbiology. Microbiology with Diseases by Taxonomy*. 2nd ed. Pearson International Edition; 2007. p. 288-303.
3. Karin Nordin. Vad är resistenta bakterier? *Forskning*. se [www]. [Uppdaterat 2012-06-23, hämtat 2013-04-05]. Hämtat från: <http://www.forskning.se/nyheterfakta/teman/resistentabakterier/tiofragorochsvar/vadarresistentabakterier.5.58cbe8281209cccc8078000128.html>
4. Young-Won Chin, Marcy J. Balunas, Hee Byung Chai, and A. Douglas Kinghorn. Drug Discovery from Natural Sources. *The AAPS Journal*. 2006; 8 (2): 239-253.
5. János Bérdy. Bioactive Microbial Metabolites. *J.Antibiotic*. 2005; 58(1): 1-26. (Review).
6. Sjukdomsinformation om actinomycos. *Smi.se* [www]. Smittskyddsinstitutet. [Uppdaterat 2010-12-30, hämtad 2013-04-12]. Hämtat från: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/actinomycos/>
7. Soil Microorganism – Actinomycetes. *Agriinfo.in* [www]. [Cited 2013-04-16]. Cited from: <http://agriinfo.in/?page=topic&superid=5&topicid=148>
8. Valli S, Suvathi Sugasini S, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth Kumar P, Reena A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(6): 469-473.
9. Bredholdt H, Galatenko OA, Engelhardt K, Fjaervik E, TTereshkova, Zotchev SB. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental microbiology*. 2007 Nov; 9(11):2756-64.
10. Phylogeny and Protein Signatures for Actinobacteria (HighG+C Gram Positive Bacteria). *bacterialphylogeny.com* [www]. Bacterial Prokaryotic Phylogeny. [hämtad 2013-04-07]. Hämtad från: <http://www.bacterialphylogeny.com/groupspecific/actinobacteria/actinobacteria.html>
11. Nina M. Haste, Varahenage Perera¹, Katherine N. Maloney, Dan N. Tran, Paul Jensen, William Fenical et al. Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics* .2010; 63(5):219- 224.

12. Thomas O. Larsen, Jørn Smedsgaard, Kristian F. Nielsen, Michael E. Hansen and Jens C. Frisvad. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural product reports*. 2005 6(22) 672-695.
13. Fredrik Blomstrand. MRSA – Motståndskraftiga gula stafylokocker. 1177.se [www]. Landsting och regioner. [Uppdaterat 2011-10-19, hämtat 2013-04-05]. Hämtat från: <http://www.1177.se/Fakta-och-rad/Sjukdomar/MRSA---Motstandskraftiga-gula-stafylokocker/>
14. Sjukdomsinformation om meticillinresistenta gula stafylokocker (MRSA). SMI.se [www]. Smittskyddsinstitutet. [Uppdaterat 2010-07-29, hämtat 2013-04-14]. Hämtat från: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/meticillinresistenta-gula-stafylokocker/>
15. Margareta Rindforth Gillgren. MRSA. Vårdguiden.se [www]. Stockholms läns landsting. [Uppdaterat 2012-09-03, hämtat 2013-05-04]. Hämtat från: <http://www.vardguiden.se/Sjukdomar-och-rad/Omraden/Sjukdomar-och-besvar/MRSA-/>
16. Nina M. Haste, Lauge Farnaes, Varahenage R. Perera, William Fenical, Victor Nizet, Mary E. Hensler. Bactericidal Kinetics of Marine-Derived Napyradiomycins against Contemporary Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Marine Drugs*. 2011. 9(4), 680-689.
17. George Sakoulas, Sang-Jip Nam, Sandra Loesgen, William Fenical, Paul R. Jensen, Victor Nizet et al. Novel Bacterial Metabolite Merochlorin A Demonstrates in vitro Activity against Multi-Drug Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PloSone*. 2012, 7(1): e29439.
18. Nina M. Haste, Chambers C. Hughes, Dan N. Tran, William Fenical, Paul R. Jensen, Victor Nizet, and Mary E. Hensler. Pharmacological Properties of the Marine Natural Product Marinopyrrole A against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 2011. 55 (7): 3305–3312.
19. Peng Sun, Katherine N. Maloney, Sang-Jip Nam, Nina M. Haste, Ritesh Raju, William Aalbersberg, Paul R. Jensen, Victor Nizet, Mary E. Hensler, William Fenical. Fijimycins A–C, three antibacterial etamycin-class depsipeptides from a marine-derived *Streptomyces* sp. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2011; 19(22): 6557–6562.
20. Sathish Kumar S.R, Kokati Venkata Bhaskara Rao. In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012. 2 (10): 787-92.
21. Differences between in vitro, in vivo and in silico studies. MPKB.org [www]. Autoimmunity Research Foundation. [Updated 01-02-2012, cited 04-05-2013]. Cited from:

http://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies#in_vivo_studies

22. Markus A. Zeitlinger, Hartmut Derendorf, Johan W. Mouton, Otto Cars, William A. Craig, David Andes, and Ursula Theuretzbacher. Protein Binding: Do We Ever Learn? *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 2011. 55 (7): 3067–3074.

9. Förkortningslista

- CA-MRSA: Samhällsassocierade *S. aureus*
- HA-MRSA: Samhällsassocierade *S. aureus*
- Cfu: kolonibildande enhet
- GISA: Glykopeptidresistenta intermediära *Staphylococcus aureus*
- HTC: Humana adenokarcinomaceller i kolon
- IC₅₀ värde: Den halva maximala hämmande koncentrationen
- MHA: Mueller-Hinton agar
- MHB: Mueller-Hinton-buljong
- MIC: Minsta inhiberande koncentrationen
- MIC 100: Den minsta koncentrationen av en förening som kan ge en hundra procent inhibering av bakteriernas tillväxt.
- MNA: Näringsmodifierad agarplattor
- MRSA: Meticillinresistent *Staphylococcus aureus*/ Multiläkemedelsresistent *Staphylococcus aureus*
- MSSA: Meticillin- känsliga *S. aureus*
- PAE: Post-antibiotisk effekt
- PBS: Fosfatbuffrad saltlösning
- SAR: Strukturell aktivitets samband
- VISA: Vankomycinintermediat resistent *Staphylococcus aureus*
- VRE: Vancomycin-resistent *enterococcus faecalis*
- VRSA: Vancomycinresistent *Staphylococcus aureus*



Kemiska institutionen
901 87 Umeå, Sweden
Telefon : 090-786 50 00
Texttelefon 090-786 59 00
www.umu.se