

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Doktorski studij
Biofizika



Doktorski rad

**SINTEZA I BIOLOŠKA AKTIVNOST MONO- I
BISKVATERNIH AMONIJEVIH SPOJEVA NA
OKOSNICI 1-AZABICIKLO[2.2.2]OKTANA**

Antonio Sabljic

Split, rujan 2025.

University of Split

Faculty of Science

PhD Study of

Biophysics



Doctoral thesis

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF
MONO- AND BISQUATERNARY AMMONIUM
COMPOUNDS ON THE BACKBONE OF
1-AZABICYCLO[2.2.2]OCTANE

Antonio Sabljic

Split, September 2025

Ova doktorska disertacija izrađena je na Odjelu za kemiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu pod voditeljstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Matilde Šprung i komentorice prof. dr. sc. Renate Odžak u okviru dokorskog studija Biofizika na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu.

Izrada disertacije financirana je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost kroz projekte „Razvoj karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ i uspostavnim istraživačkim projektom „Otkriće i razvoj novih biološki aktivnih kvaternih amonijevih spojeva derivata kinuklidina“ (QACBioAct, UIP-2020-02-2356), voditeljice izv. prof. dr. sc. Matilde Šprung.



Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom **HRZZ-UIP-2020-02-2356**.

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju, Doktorski studij Biofizika

**SINTEZA I BIOLOŠKA AKTIVNOST MONO- I BISKVATERNIH
AMONIJEVIH SPOJEVA NA OKOSNICI 1-AZABICIKLO[2.2.2]OKTANA**

Doktorski rad Antonia Sabljica, mag. chem., kao dio obveza potrebnih da se dobije doktorat znanosti, izrađen je pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Matilde Šprung i komentorice prof. dr. sc. Renate Odžak.

Dobiveni akademski naziv i stupanj: doktor prirodnih znanosti.

Povjerenstvo za ocjenu i obranu doktorskog rada u sastavu:

1. prof. dr. sc. Ivica Blažević, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu – predsjednik,

2. izv. prof. dr. sc. Ivana Mitar, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu – članica

3. izv. prof. dr. sc. Rosana Ribić, Odjel za sestrinstvo, Sveučilište Sjever u Varaždinu –
članica _____
4. izv. prof. dr. sc. Stjepan Orhanović, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu –
zamjenski član _____

Potvrđuje da je disertacija obranjena dana _____.

Voditelj doktorskog studija: izv. prof. dr. sc. Damir Kovačić

V. d. dekana: prof. dr. sc. Ante Bilušić

**SINTEZA I BIOLOŠKA AKTIVNOST MONO- I BISKVATERNIH AMONIJEVIH
SPOJEVA NA OKOSNICI 1-AZABICIKLO[2.2.2]OKTANA**

2025.

Antonio Sabljic

Doktorska disertacija izrađena na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

Sažetak

Pojava antimikrobne rezistencije, osobito kod multirezistentnih sojeva, predstavlja sve izraženiji globalni zdravstveni izazov. Kvaterni amonijevi spojevi su kationski surfaktanti s jakim antimikrobnim djelovanjem, no široka primjena komercijalnih Sintezaka dovela je do razvoja otpornosti. U okviru ove disertacije sintetizirane su nove mono- i biskvaterne amonijeve soli 3-supstituiranog kinuklidina, s varijacijama u duljini alkilnog lanca, funkcionalnih skupina na okosnici te različitosti poveznica. Identifikacija novosintetiziranih spojeva je potvrđena određivanjem njihovih tališta i NMR spektroskopijom. Biološka aktivnost ispitana je metodama kao što su određivanje minimalne inhibitorne koncentracije, kinetike bakterijskog rasta, potencijala razvoja rezistencije, antibiofilmskog učinka i propusnosti membrane prema propidijevom jodidu. Od fizikalno-kemijskih svojstva određene su vrijednosti kritične micelarne koncentracije, $cLogP$ -a i PAMPA-e. Ispitivani derivati pokazali su izraženu baktericidnu aktivnost, uključujući inhibiciju biofilma i induciranje stanične smrti destabilizacijom membrane. Dobiveni rezultati i odnosi strukture i aktivnosti omogućuju daljnji racionalni dizajn analoga poboljšane učinkovitosti i sigurnosti za potencijalnu primjenu u terapiji infekcija uzrokovanih rezistentnim patogenima.

(154 stranica, 87 slika, 8 tablica, 178 literaturnih navoda, 44 priloga, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u: Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Ključne riječi: antimikrobna rezistencija, kinuklidin, monokvaterne amonijeve soli, biskvaterne amonijeve soli, minimalna inhibitorna koncentracija

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Matilda Šprung

Komentorica: prof. dr. sc. Renata Odžak

Ocjenjivači:

1. prof. dr. sc. Ivica Blažević – predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Mitar – članica
3. izv. prof. dr. sc. Rosana Ribić – članica
4. izv. prof. dr. sc. Stjepan Orhanović – zamjenski član

Rad prihvaćen:

**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF MONO- AND BISQUATERNARY
AMMONIUM COMPOUNDS ON THE BACKBONE OF 1-AZABICYCLO[2.2.2]OCTANE**

2025

Antonio Sabljic

Ph.D. Thesis performed at Faculty of Science, University of Split

Abstract

The emergence of antimicrobial resistance, particularly among multidrug-resistant strains, represents an increasingly significant global health challenge. Quaternary ammonium compounds are cationic surfactants with strong antimicrobial activity, yet the widespread use of commercial agents has led to the development of resistance. In this dissertation, novel mono- and bis-quaternary ammonium salts of 3-substituted quinuclidine were synthesized, with variations in alkyl chain length, functional groups on the scaffold, and different linker types. The identity of the newly synthesized compounds was confirmed through melting point determination and NMR spectroscopy. Their biological activity was evaluated using methods such as minimum inhibitory concentration determination, bacterial growth kinetics, potential for resistance development, antibiofilm activity, and membrane permeability assessed via propidium iodide uptake. Physicochemical properties, including critical micelle concentration, $cLogP$, and PAMPA permeability, were also determined. The tested derivatives exhibited pronounced bactericidal activity, including biofilm inhibition and induction of cell death through membrane destabilization. The obtained results, along with structure–activity relationships, provide a foundation for the rational design of analogs with improved efficacy and safety for potential application in the treatment of infections caused by resistant pathogens.

(154 pages, 87 figures, 8 tables, 178 references, 44 supplementary materials, original in Croatian)
Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, University Library in Split,
Library of the Faculty of Science University of Split

Keywords: Antimicrobial resistance, quinuclidine, monoquaternary ammonium salts, bisquaternary ammonium salts, minimum inhibitory concentration

Mentor: Assoc. Prof. Matilda Šprung, PhD
Comentor: Prof. Renata Odžak, PhD

Reviewers:

1. Prof. Ivica Blažević, PhD – Chair
2. Assoc. Prof. Ivana Mitar, PhD – Member
3. Assoc. Prof. Rosana Ribić, PhD – Member
4. Assoc. Prof. Stjepan Orhanović, PhD – Substitute member

Thesis accepted:

ZAHVALE

Zahvaljujem svojim mentoricama, izv. prof. dr. sc. Matildi Šprung i prof. dr. sc. Renati Odžak, što su me prepoznale kao svojeg doktoranda te me kroz protekle četiri godine mentorirale te mi omogućile da uspješno privedem kraju svoj znanstveno-istraživački rad i izradu ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ines Primožić na akviziciji i interpretaciji ^1H NMR i ^{13}C NMR spektara, kao i dr. sc. Almi Ramić na pomoći pri pripremi uzoraka i obradi podataka.

Posebnu zahvalnost dugujem kolektivu Odjela za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, koji me srdačno prihvatio i učinio ove četiri godine ne samo profesionalno ispunjenima, nego i iznimno ugodnima za rad i razvoj.

Zahvaljujem dr. sc. Ireni Dukić na uvijek dostupnoj i nesebičnoj pomoći, strpljenju i spremnosti da odgovori na svaki upit tijekom cijelog trajanja poslijediplomskog dokorskog studija Biofizika.

Neizmjereno sam zahvalan svojoj obitelji, koja je, unatoč fizičkoj udaljenosti, bila moj stalni oslonac i podrška u svakom trenutku.

Zahvaljujem i dragim prijateljima, koji su moj boravak u Splitu obogatili radošću, smijehom i nezaboravnim trenucima.

Na kraju, s dubokom zahvalnošću upućujem riječi hvale dragom Bogu, koji je sve ovo oblikovao u jednu posebnu životnu priču. Kako kaže poznata misao: *"Ako je Bog s tobom – čega se bojiš, ako nije – čemu se nadaš?"*

Hvala Vam svima,

Antonio Sabljčić

SKRAČENICE

QACs	kvaterne amonijeve soli
monoQACs	monokvaterne amonijeve soli
bisQACs	biskvaterne amonijeve soli
poliQACs	polikvaterne amonijeve soli
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MRSA	meticilin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> s posrednom otpornošću na vankomicin
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
QNH ₂	(±)-3-aminokinuklidin
QO	kinuklidin-3-on
QBn	(±)-3-benzamidokinuklidin
QAc	(±)-3-acetamidokinuklidin
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MBIC	minimalna-baktericidna koncentracija
DABCO	1,4-diazabiciklo[2.2.2]oktan
Ftsz	Vlaknasti protein Z osjetljiv na temperaturu
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> - tetrametiletilendiamin
TMPG	<i>N,N,N',N'</i> - tetrametil-1,3-propandiamin
MBEC	minimalna koncentracija za uništavanje biofilma
SEM	pretražni elektronski mikroskop
TEM	transmisijski elektronski mikroskop
IC ₅₀	polovica maksimalne inhibitorne koncentracije
EtOH	etanol
MeOH	metanol
AcN	acetonitril
Ace	aceton
Et ₂ O	dietil-eter
NaBH ₃ CN	natrijev cijanoborhidrid
Bn	benzilna skupina- C ₆ H ₅ CH ₂ –
t-Bu	tert-butilna skupina
Et ₃ N	triethylamin
S.t.	sobna temperatura
Nu	nukleofil
S _N 2	bimolekularna nukleofilna susptitucija

Sadržaj

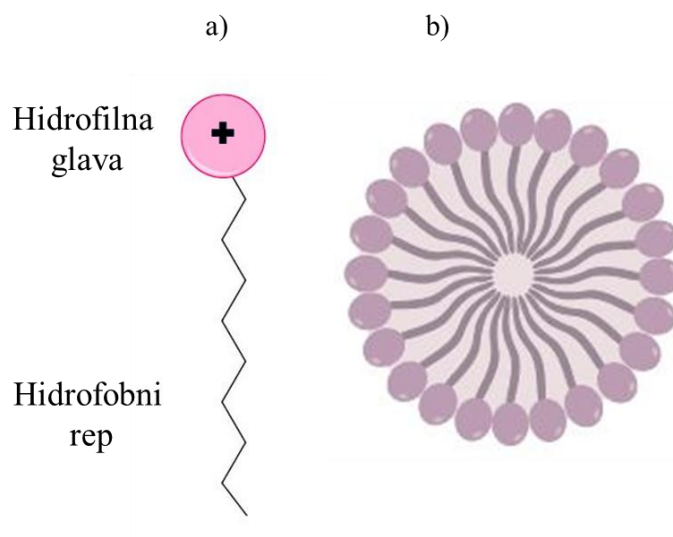
1. Uvod	1
2. Literaturni pregled	5
2.1. Odnosi strukture i aktivnosti kvaternih amonijevih spojeva	10
3. Eksperimentalni dio	44
3.1. Sintaza QACs	44
3.1.1. Sintaza monoQACs	47
3.1.1.4. (±)- <i>N</i> -Dodecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid (QBn-C₁₂)	47
3.1.1.5. (±)- <i>N</i> -Tetradecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid (QBn-C₁₄)	48
3.1.1.6. (±)- <i>N</i> -Heksadecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid (QBn-C₁₆)	48
3.1.1.7. (±)- <i>N</i> -Dodecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid (QAc-C₁₂)	49
3.1.1.8. (±)- <i>N</i> -Tetradecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid (QAc-C₁₄)	49
3.1.1.9. (±)- <i>N</i> -Heksadecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid (QAc-C₁₆)	49
3.1.1.10. (±)- <i>N</i> -Dodecil-3-aminokinuklidinijev bromid (QNH₂-C₁₂)	50
3.1.1.11. (±)- <i>N</i> -Tetradecil-3-aminokinuklidinijev bromid (QNH₂-C₁₄)	51
3.1.1.12. (±)- <i>N</i> -Heksadecil-3-aminokinuklidinijev bromid (QNH₂-C₁₆)	51
3.1.1.13. Dodecil-3-oksokinuklidinijev bromid (QO-C₁₂)	52
3.1.1.14. Tetradecil-3-oksokinuklidinijev bromid (QO-C₁₄)	52
3.1.1.15. Heksadecil-3-oksokinuklidinijev bromid (QO-C₁₆)	52
3.1.1.16. (±)-3-amino-1-(2-(dodecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev bromid (QNH₂-ADC₁₂)	54
3.1.1.17. (±)-3-amino-1-(2-(tetradecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev bromid (QNH₂-ADC₁₄)	54
3.1.1.18. (±)-3-amino-1-(2-(heksadecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev bromid (QNH₂-ADC₁₆)	55
3.1.2. Sintaza bisQACs	56
3.1.2.4. 1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid (2(QO)₃)	56
3.1.2.5. 1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid (2(QO)₄)	56
3.1.2.6. 1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid (2(QO)₆)	57
3.1.2.7. (±)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₂)₃)	58
3.1.2.8. (±)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₄)₃)	58

3.1.2.9. (±)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₆)₃)	59
3.1.2.10. (±)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₂)₄)	59
3.1.2.11. (±)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₄)₄)	60
3.1.2.12. (±)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₆)₄)	60
3.1.2.13. (±)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₂)₆)	61
3.1.2.14. (±)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₄)₆)	61
3.1.2.15. (±)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₆)₆)	62
3.2. Evaluacija amfifilnih i farmakokinetičkih svojstava spojeva	62
3.2.1. Odnos strukture i aktivnosti	62
3.2.2. Određivanje kritične micelarne koncentracije	63
3.2.3. Izračun molekulskih deskriptora	64
3.2.4. Procjena permeabilnosti spojeva.....	66
3.3. Biološka aktivnost	67
3.3.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije	68
3.3.2. Određivanje kinetike inhibicije bakterijskog rasta.....	69
3.3.3. Određivanje potencijala razvoja bakterijske rezistencije.....	69
3.3.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije bakterijskih biofilmova	70
3.3.5. Određivanje viabilnosti stanica u vremenu klasičnom metodom nasijavanja i prebrojavanja tretiranih stanica	71
3.4. Mehanizam djelovanja.....	71
3.4.1. Test propusnosti membrane prema propidijevom jodidu (PI-uptake assay)	71
4. Rezultati i diskusija	73
4.1. Sinteza mono- i biskvaternih amonijevih spojeva	73
4.2. Evaluacija amfifilnih i farmakokinetičkih svojstava spojeva	78
4.2.1. <i>In silico</i> analiza vezanja bisQACs na regulatorni protein QacR.....	78
4.2.2. Kritična micelarna koncentracija	81
4.2.3. Molekulski deskriptori	88
4.2.4. Permeabilnost spojeva.....	90

4.3. Mikrodilucijske metode	92
4.3.1. Minimalna inhibitorna koncentracija mono- i biskvaternih amonijevih spojeva	92
4.3.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti monokvaternih amonijevih spojeva u različitim hranidbenim medijima	100
4.3.3. Kinetika inhibicije bakterijskog rasta mono- i biskvaternih amonijevih spojeva	102
4.3.4. Potencijal razvoja bakterijske rezistencije mono- i biskvaternih amonijevih spojeva	109
4.3.5. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije bakterijskih biofilmova mono- i biskvaternih amonijevih spojeva.....	113
4.3.6. Određivanje viabilnosti stanica u vremenu klasičnom metodom nasijavanja i prebrojavanja tretiranih stanica	122
4.4. Mehanizam djelovanja.....	127
4.4.1. Test propusnosti membrane prema propidijevom jodidu (PI Uptake assay) spektrofluorimetrijom	127
5. Zaključci	130
6. Literatura	133
Prilozi	
Životopis	

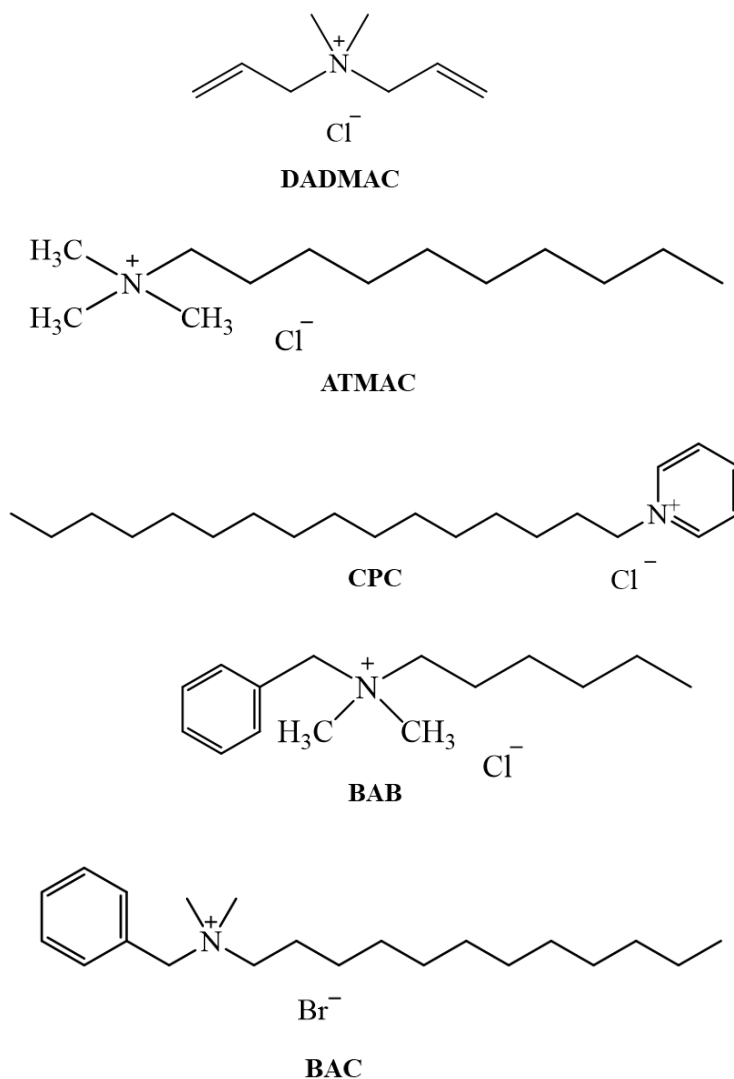
1. Uvod

Širenje bakterijske rezistencije postaje sve veći globalni problem, a jedan od glavnih uzroka ove pojave je nekontrolirana i prekomjerna uporaba antimikrobnih sredstava, uključujući dezinfekcijska sredstva i antiseptike.¹ Ova praksa doprinosi selektivnom pritisku koji favorizira razvoj rezistentnih sojeva bakterija, što značajno ograničava učinkovitost postojećih terapija. Zbog toga su današnja znanstvena istraživanja usmjerena prema razvoju novih antimikrobnih reagensa s inovativnim strukturnim varijantama, koje bi smanjile mogućnost razvoja otpornosti kod patogenih mikroorganizama.² Kvaterni amonijevi spojevi (QACs) čine grupu spojeva, kationskih surfaktanata s izrazitim antimikrobnim svojstvima. S obzirom na jednostavnost i ekonomičnost njihove sinteze, kao i snažnu biološku aktivnost, QACs su predmet istraživanja još od prve polovice 20. stoljeća.^{3–7} Ključno svojstvo surfaktanata poput QACs je njihova sposobnost samoorganiziranja u micle, karakterizirana kritičnom micelarnom koncentracijom (cmc) koja je bitna za razumijevanje njihove površinske aktivnosti i učinkovitosti u različitim primjenama, slika 1. Kroz godine, razvijene su brojne QACs koje se danas koriste kao učinkoviti agensi u borbi protiv širokog spektra mikroorganizama, uključujući bakterije, viruse i gljivice.



Slika 1. Shematski prikaz građi kationskog surfaktanta (a) i agregatne forme, micle (b).

Komercijalno dostupne QACs, poput cetilpiridinijevog klorida (CPC), benzalkonijevog klorida (BAC), alkiltrimetilamonijevog klorida (ATMAC) i didecildimetilamonijevog klorida (DADMAC), našli su široku primjenu u industrijskim i potrošačkim proizvodima, uključujući dezinfekcijske preparate, antiseptike, kozmetičke proizvode i sredstva za njegu kože, slika 2.^{2,8} Na primjer, CPC, jedan od najjednostavnijih QACs, prvi je put opisan 1939. godine, a i danas se koristi kao aktivni sastojak u vodicama za ispiranje usta i drugim proizvodima za oralnu higijenu, zbog svoje dokazane učinkovitosti u smanjenju bakterijske populacije.⁹



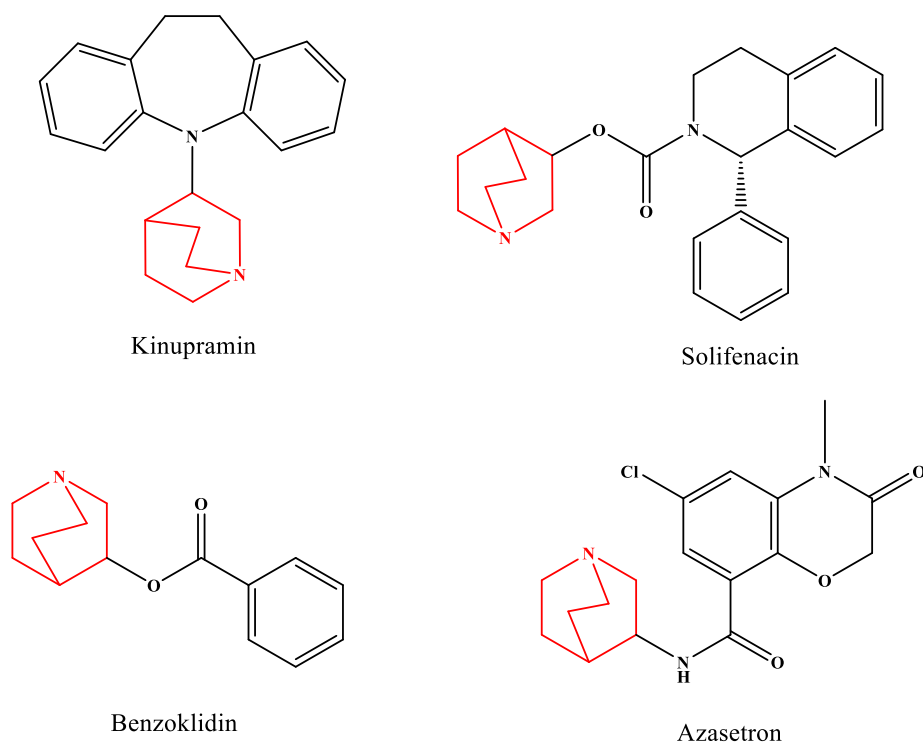
Slika 2. Prikaz kemijskih struktura komercijalnih kvaternih amonijevih spojeva (QACs).¹⁰

Iako QACs nude brojne prednosti, poput širokog spektra djelovanja, niske toksičnosti i lakoće primjene, njihova sve veća uporaba može dovesti do razvoja bakterijske rezistencije. Stoga je nužno razviti nove generacije QACs s različitim strukturnim karakteristikama, kako bi se smanjila mogućnost razvoja bakterijske rezistencije i osigurala dugoročna učinkovitost ovih antimikrobnih reagensa.¹¹

Ranija istraživanja pokazala su da se 3-supstituirani kinuklidin, može kvaternizirati arilnim i/ili alkilnim supstituentima dajući kvaterne amonijeve spojeve širokog spektra antimikrobnih aktivnost.^{12–15}

Azabiciklo[2.2.2]oktan ili kinuklidin je dio strukture alkaloida izoliranog iz kore drveta kininovca te je sastavni dio strukture brojnih prirodnih i sintetskih biološki aktivnih spojeva, slika 3., kinuklidin također igra ključnu ulogu u organskoj stereoselektivnoj sintezi, posebno kao komponenta katalizatora.¹⁶ U narodnoj medicini, poznati su derivati kinuklidina koji su se koristili za liječenje malarije i srčane aritmije, a neke njihove strukturne varijante i danas se upotrebljavaju u medicinske svrhe.¹⁷ Ovaj biciklički sustav, koji uključuje dušikov atom u premještaju, ključan je za određivanje stereokemijskih svojstava i biološke aktivnosti spomenutih spojeva.

Stvaranje kinuklidinijevih derivata omogućava ciljanu modifikaciju interakcija sa specifičnim biološkim receptorima, što je od esencijalne važnosti u razvoju lijekova.¹⁸ Takvi spojevi omogućuju precizno usmjeravanje farmakoloških učinaka, čime se optimizira selektivnost i smanjuju nuspojave. S obzirom na ove karakteristike, kinuklidinijev prsten predstavlja ključnu strukturnu jedinicu u farmaceutskoj industriji, posebno u dizajnu i optimizaciji terapijskih reagensa s visokim stupnjem stereoselektivnosti i biološke efikasnosti.^{19,20}



Slika 3. Prikaz različitih struktura lijekova s kinuklidinijevim prstenom.

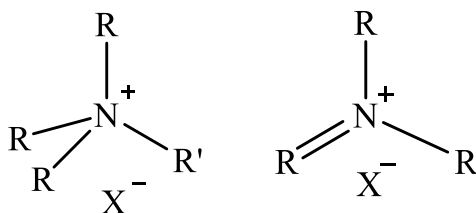
Uzimajući u obzir ranija istraživanja te biološki potencijal prirodnih strukturnih okosnica kao i potencijal bisQACs, u ovoj doktorskoj disertaciji predlažemo sinteze novih mono- i biskvaternih soli 3-supstituiranih kinuklidina.^{21,22} Budući da bisQACs kinuklidina kao i neke njegove *meke* monoQACs varijante još nisu opisane u literaturi, smatramo da bi ovo istraživanje moglo otvoriti nove mogućnosti u racionalnom dizajnu nove generacije kvaternih soli, koje odlikuje visoka specifičnost i snižena toksičnost uz zadržavanje poželjne antimikrobne aktivnosti.

Prvi dio doktorske disertacije fokusira se na sintetske pristupe novih mono- i biskvaternih amonijevih soli temeljenih na prirodnoj okosnici kinuklidina. 3-Supstituirani derivati kinuklidina nudi potencijal za razvoj novih QACs s poboljšanim biološkim svojstvima, uključujući pojačanu antimikrobnu aktivnost i mogućnost modifikacije stereokemijskih karakteristika.²³ Drugi dio istraživanja obuhvaća temeljito ispitivanje biološke aktivnosti sintetskih spojeva, uključujući analize mehanizama djelovanja koristeći mikrobiološke i

biofizikalne tehnike i metode kao i identifikaciju sintetiziranih spojeva. Uz to, istraživao je odnos između strukture i aktivnosti (SAR) QACs u interakciji s transkripcijskim regulatornim proteinom QacR. Pokazano je da sustavne varijacije u duljini alkilnog lanca i poveznica značajno moduliraju afinitet vezanja na transkripcijski represor QacR – ključni regulator uključen u aktivaciju efluks sustava višestruke rezistencije u patogenim bakterijama.²⁴ Dodatno su analizirana odabrana fizikalno-kemijska svojstva, uključujući izračunati $cLogP$ te određenu kritičnu micelarnu koncentraciju (cmc). Utvrđeno je da se vrijednost cmc-a progresivno smanjuje s porastom duljine alkilnog lanca, što je u skladu s jačanjem hidrofobnih interakcija koje potiču micelizaciju. Opaženi trend upućuje na to da produljenje alkilnog lanca povećava površinsku aktivnost, čime se omogućuje učinkovitije pakiranje molekula na međupovršini zrak–voda. Ovaj multidisciplinarni pristup omogućit će detaljno razumijevanje biokemijskih interakcija između novih kinuklidinijevih derivata i ciljnih mikroorganizama, kao i mehanizama koji doprinose rezistenciji, osobito u kontekstu multirezistentnih sojeva. Očekivani rezultati ove doktorske disertacije omogućit će daljnji napredak u razumijevanju odnosa između strukture i biološke aktivnosti QACs, pružajući dublje uvide u mehanizme djelovanja tih spojeva, uključujući potencijalne puteve razvoja mikrobiološke rezistencije. Na temelju tih saznanja, moguće je dizajnirati nova, učinkovitija rješenja za prevenciju i kontrolu širenja zaraznih bolesti, osobito onih izazvanih multirezistentnim patogenima.

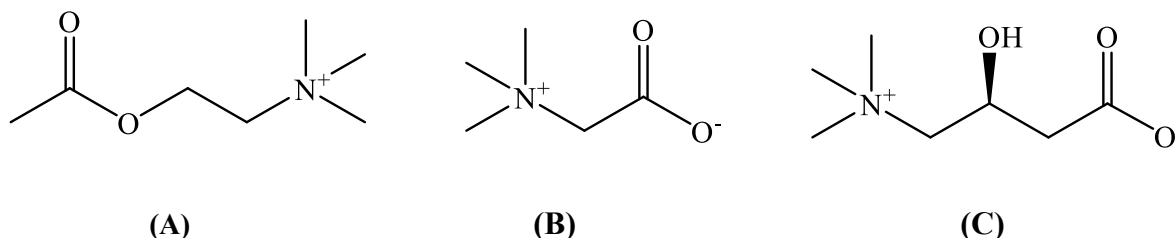
2. Literaturni pregled

Kvaterni amonijevi spojevi (QACs) su klasa kationskih spojeva koja obuhvaća prirodne i sintetske derivate. Zbog pozitivnog naboja dušikovog atoma, široko se primjenjuju u različitim područjima, uključujući antiseptike, dezinficijense i antimikrobne agense, ali i kao surfaktante, konzervanse, sredstva za modifikaciju površina te u industrijskim i poljoprivrednim procesima.²⁵ Osnovni strukturni element QACs je pozitivno nabijenog atoma dušika, na koji su vezana četiri supstituenta označena kao -R skupine, slika 4. Ovi supstituenti mogu biti alkilni, arilni ili kombinacija oba, a njihova priroda značajno utječe na fizikalno-kemijska svojstva i biološku aktivnost QACs. Kvaterni atom dušika u ovoj strukturi osigurava pozitivan naboj koji omogućuje interakciju s negativno nabijenim dijelovima staničnih membrana, što je osnova za njihov antimikrobni učinak.^{4,25}



Slika 4. Moguće strukture QACs.²⁶

Predstavnici ove klase QACs uključuju acetilkolin, betain i levokarnitin, slika 5, koji igraju značajnu biološku ulogu u različitim fiziološkim procesima.



Slika 5. Prikaz kemijskih struktura (A) acetilkolina, (B) betaina i (C) levokarnitina.¹

Baza podataka *DrugBank* sadrži više od 390 molekula koje pripadaju kvaternim amonijevim spojevima, od kojih je 95 odobreno za upotrebu u kliničkoj praksi. Primjeri takvih molekula uključuju ambenonij, heksociklijev metilsulfat i propantelin bromid, koji se koriste u različitim terapijskim područjima. Ove molekule često pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost, naročito protiv Gram-pozitivnih bakterija, gljivica i virusa.²⁷

Antimikrobna aktivnost QACs prvi put je istraživana početkom 20. stoljeća, kada su kirurzi počeli koristiti ova sredstva za predoperativnu higijenu i dezinfekciju ruku.

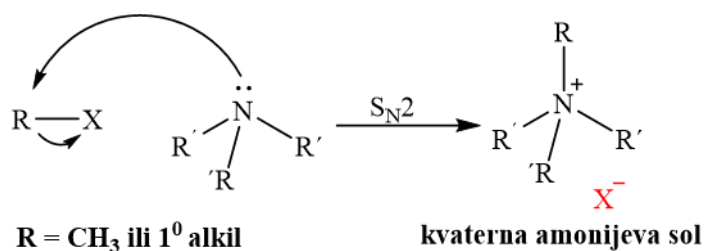
S kemijskog gledišta, ključna obilježja QACs su njihova amfifilna struktura (hidrofobni i hidrofilni dio) i ukupni pozitivan naboj. Ova svojstva omogućuju im interakciju s negativno nabijenim komponentama stanične membrane, što je temelj za razvoj novih antibakterijskih reagensa koji imitiraju mehanizme djelovanja prirodnih antimikrobnih peptida. Mehanizam djelovanja QACs, sličan je onome kod detergenata, najčešće uključuje depolarizaciju stanične membrane bakterija, uzrokujući njeno oštećenje i poremećaj u funkciji membrane, što rezultira

smrću bakterije. Ovaj način djelovanja osigurava širok spektar aktivnosti, osobito protiv Gram-pozitivnih bakterija, zbog specifičnih interakcija s lipidnim komponentama membrane.^{28–30}

Iako su brojni QACs pokazali značajan antibakterijski učinak, s godinama je rastao problem bakterijske otpornosti na ove tvari. Razvijanje novih QACs s visokom učinkovitošću, niskom osjetljivošću na razvoj otpornosti i širokim spektrom djelovanja postalo je ključno za daljnji napredak u antiinfektivnoj terapiji.^{31,32} Neki QACs poput cetalkonija i ekseporfinijevog klorida već su ušli u klinička ispitivanja i postigli značajan napredak u terapiji infekcija.^{33,34} S obzirom na rastuću prijetnju bakterijske rezistencije i smanjenje broja novih antibakterijskih reagensa, postoji velika potreba za istraživanjem novih, učinkovitijih QACs koji bi mogli prevladati postojeću otpornost i pružiti alternative u borbi protiv infektivnih bolesti. QACs koji su istraživani u posljednjem desetljeću, klasificiraju se na temelju njihove kemijske strukture (lančana ili aromatska) te broja neto pozitivnih naboja.³⁵

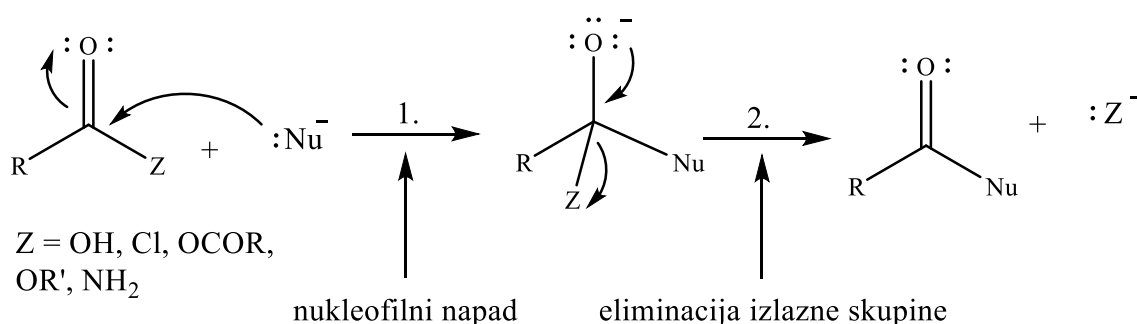
Kvaterne amonijeve soli (QACs) predstavljaju važnu klasu spojeva čija biološka aktivnost uvelike ovisi o načinu njihove sinteze i vrsti uvedenih funkcionalnih skupina. U ovoj doktorskoj disertaciji korištene su organske transformacije koje omogućuju selektivnu funkcionalizaciju molekule u svrhu postizanja željene strukture i svojstava QACs. Među ključnim strategijama ističu se Menshutkinova reakcija kao temeljni pristup kvaternizaciji amina, nukleofilna acilna supstitucija za uvođenje acilnih fragmenata, te reduktivna aminacija kojom se učinkovito ostvaruje konverzija karbonilnih spojeva u aminske derivate. U nastavku su opisane osnovne značajke i mehanizmi navedenih reakcija, kao i njihova primjena u okviru ovog istraživanja.

Menshutkinova reakcija ili reakcija kvaternizacije je reakcija kojom nastaju kvaterne amonijeve soli. U ovoj reakciji dolazi do alkilacije tercijarnih amina sa primarnim alkil halogenidima. Iz shematskog prikaza na slici 6, vidljivo je da novim korakom reakcije nastaje nova ugljik dušik veza. Reakcijom nukleofilne supstitucije alkil halogenida s tercijarnim aminom nastaje produkt kvaterna amonijeva sol. Reakcije kvaternizacije slijede S_N2 mehanizam koji je zapravo reakcija nukleofilne supstitucije drugog reda, odnosno u jednom koraku dolazi do nukleofilnog napada dušika na ugljikov atom, koji je vezan sa halogenim elementom kao i odlazak halogenida sa ugljikovog atoma, drugim riječima i alkil halogenid i nukleofil utječu na brzinu kemijske reakcije. Upravo zbog toga što reakcije kvaternizacije slijede S_N2 mehanizam alkil halogenid za dobivanje kvaternih amonijevih soli mora biti ili metil halogenid (CH₃X) ili primarni alkil halogenid (RCH₂X).²⁶



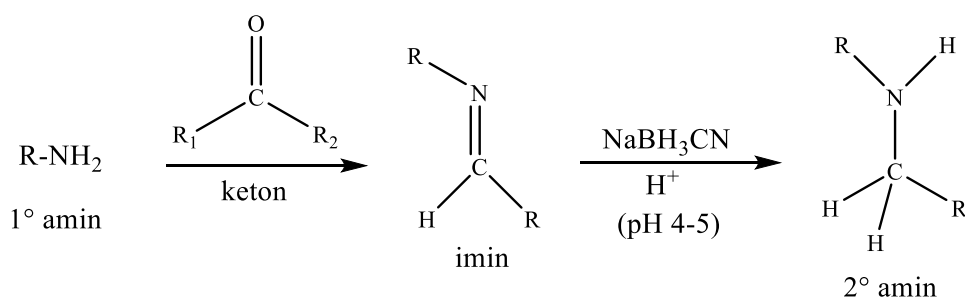
Slika 6. Shematski prikaz mehanizma kemijske reakcije kvaternizacije.²⁶

Nukleofilna acilna supstitucija je važna klasa supstitucijskih reakcija koja uključuje nukleofil i acilni spoj, kao što su karboksilne kiseline i njihovi funkcionalni derivati (kiselinski kloridi, anhidridi, esteri i amidi). Odvija se i s negativno nabijenim nukleofilima i s neutralnim nukleofilima. U tim reakcijama, izlazna skupina koja je vezana za acilnu skupinu supstituirana je nukleofilom. Derivati karboksilnih kiselina (RCOZ) reagiraju s nukleofilima zato što posjeduju elektrofilni ugljik. Dolazi do supstitucije, a ne adicije zato što derivati karboksilnih kiselina imaju odlaznu skupinu Z na karbonilnom ugljiku. Opći mehanizam odvija se kroz dva koraka. Nukleofil napada elektrofilnu karbonilnu grupu, puca π veza, nastaje tetraedarski međuprodukt s novom C-Nu vezom, te eliminacija odlazne skupine i nastanak supstitucijskog produkta, slika 7. Karbonilna skupina ispunjava dvije funkcije, pruža mjesto za napad nukleofilnom ugljiku i povećava kiselost vodika na α ugljiku.³⁶



Slika 7. Shematski prikaz reakcijskog mehanizma nukleofilne acilne supstitucije, u kojem prvi korak uključuje nukleofilni napad na karbonilni ugljik uz nastanak tetraedarskog međuprodukta, dok drugi korak obuhvaća eliminaciju izlazne skupine.³⁶

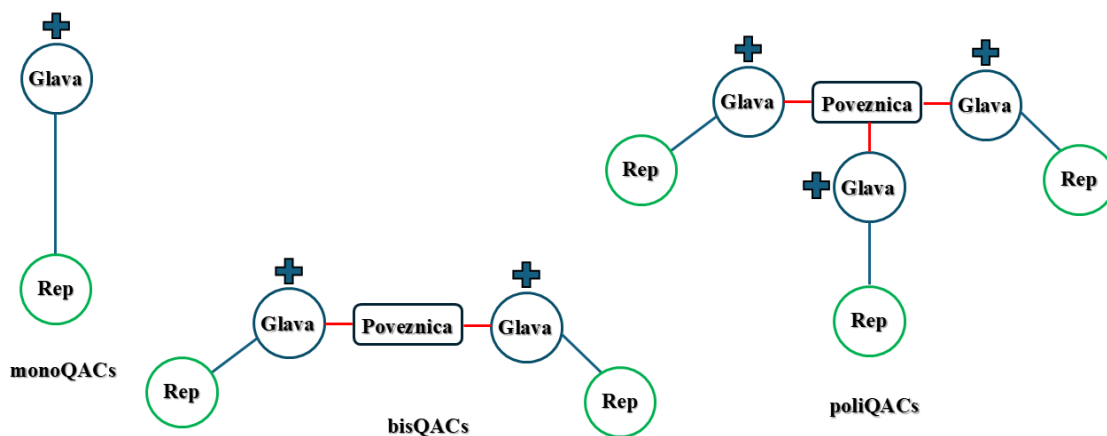
Reduktivna aminacija je kemijska reakcija koja u dva koraka koja pretvara aldehide i ketone u 1°, 2°, i 3° amine. Reduktivna aminacija zamjenjuje C=O vezu C-H i C-N vezom. Prvi korak uključuje nukleofilni napad amina na karbonilnu skupinu čime nastaje imin. Drugi korak uključuje redukciju nastalog imina, slika 8. Redukcija u organskoj kemiji znači „osiromašivanjem“ kisikom odnosno dodavanje vodika na molekulu (smanjenje oksidacijskog broja što odgovara primanju elektrona). Najučinkovitiji redukcijski agens za ovu reakciju je natrijev cijanoborhidrid (NaBH_3CN). Ovaj hidridni reagens je derivat natrijeva borohidrida (NaBH_4). Uspješna uporaba NaBH_3CN je zbog njegove stabilnosti u relativno jako kiselim otopinama, njegova topljivost u hidroksilnim otapalima kao što je metanol, i njegova različita selektivnost pri različitim pH vrijednostima. Kao redukcijsko sredstvo se može još koristiti natrijev triacetoksiborhidrid $\text{NaB}(\text{OAc})_3$ (STAB), koji je blag i selektivan redukcijski agens za reaktivnu aminaciju raznih aldehida i ketona. Veza bor-vodik stabilizirana je steričkim i elektron-odvlačćim efektom acetoksi skupina, čineći natrijev triacetoksiborohidrid blagim redukcijskim sredstvom. 1,2-dikloroetan (DCE) je preferirano reakcijsko otapalo, ali reakcije se također mogu izvesti u THF i povremeno u MeCN. Octena kiselina može se koristiti kao katalizator u reakcijama ketona. Toleriraju se funkcionalne skupine osjetljive na kiselinu kao što su acetali i ketali, te reducibilne funkcionalne skupine kao što su C-C višestruke veze te cijano i nitro skupine. Ne preporučuju se otapala poput vode ili metanola. Reakcije u metanolu rezultirale su brзом redukcijom karbonilnog spoja, a reagens u vodi bi se razgradio te oslobodio štetne samo zapaljive plinove.³⁷



Slika 8. Shematski prikaz kemijske reakcije reduktivne aminacije.³⁷

2.1. Odnosi strukture i aktivnosti kvaternih amonijevih spojeva

Kvaterni amonijevi spojevi se klasificiraju prema broju kvaternih dušikovih atoma unutar iona, što rezultira različitim kategorijama strukturnih tipova: monoQACs, bisQACs i poliQACs. MonoQACs sadrže jedan pozitivni dušikov atom, dok bisQACs posjeduju dva pozitivna dušikova atoma, a poliQACs imaju tri ili više pozitivnih dušikovih atoma u svojoj strukturi, slika 9. Ova klasifikacija odražava složenost molekule i njezine sposobnosti za interakciju s različitim tipovima ciljanih mikroorganizama, kao i specifična svojstva koja im omogućuju primjenu u različitim industrijskim granama, uključujući farmaceutsku, kozmetičku, prehrambenu i biotehničku industriju.³⁸



Slika 9. Shematski prikaz različitih struktura kvaternih amonijevih spojeva (QACs).

Antimikrobna aktivnost QACs snažno je povezana s njihovom strukturnom konfiguracijom i brojem pozitivnih dušikovih atoma. MonoQACs, s jednim kvaternim dušikovim atomom, često pokazuju visoku selektivnost prema bakterijskim membranama, zbog jednostavne strukture koja omogućava efikasno usmjeravanje i destabilizaciju stanične membrane. Ovi spojevi djeluju putem mehanizma depolarizacije membrane, što dovodi do oštećenja i smrti bakterija. BisQACs, sa dva kvaterna dušikova atoma, obično imaju jaču interakciju s membranama, što može povećati njihovu efikasnost, ali i širiti spektar djelovanja, uključujući bolje djelovanje na Gram-negativne bakterije zbog veće fleksibilnosti u međusobnim interakcijama sa staničnim komponentama.³⁹

Veći broj pozitivnih naboja u poliQACs može omogućiti još snažniji učinak na biološke membrane, kao i bolju sposobnost za interakciju s različitim vrstama patogena, uključujući viruse i gljivice. Međutim, ova kategorija spojeva obično nosi veći rizik od toksičnosti za ljudske stanice i može biti manje selektivna, što predstavlja izazov u njihovoj primjeni u medicinskoj terapiji i zaštiti okoliša.²⁵

Općenito, strukture mono- i bisQACs najviše su proučavane u kontekstu antimikrobne aktivnosti, jer su njihovi mehanizmi djelovanja bolje razumljiviji i često pokazuju vrlo visoku učinkovitost protiv širokog spektra mikroorganizama. Pored toga, ovi spojevi često pokazuju niže toksične profile prema humanim stanicama u usporedbi s poliQACs, što ih čini pogodnima za kliničku primjenu i razvoj novih terapijski aktivnih tvari.⁴⁰

Iako su kvaterni amonijevi spojevi odavno prepoznati zbog svojih antimikrobnih svojstava, izazovi u njihovoj primjeni i dalje ostaju, osobito s obzirom na sve veću otpornost mikroorganizama na tradicionalne antimikrobne agense. Razumijevanje i daljnje istraživanje odnosa između strukture i funkcije ovih spojeva bit će ključno za razvoj novih QACs s poboljšanom selektivnošću, efikasnošću i smanjenom toksičnošću.⁴¹ U nastavku slijedi sustavni pregled dosadašnjih istraživanja koja obuhvaćaju različite klase QACs, počevši od monokvaternih spojeva pa sve do polikvaternih soli. Poseban naglasak stavljen je na značajne strukturne varijante koje uključuju dugolančane alkilne derivate, heterocikličke okosnice te specifične supstituente, koji značajno utječu na biološku aktivnost ovih spojeva.

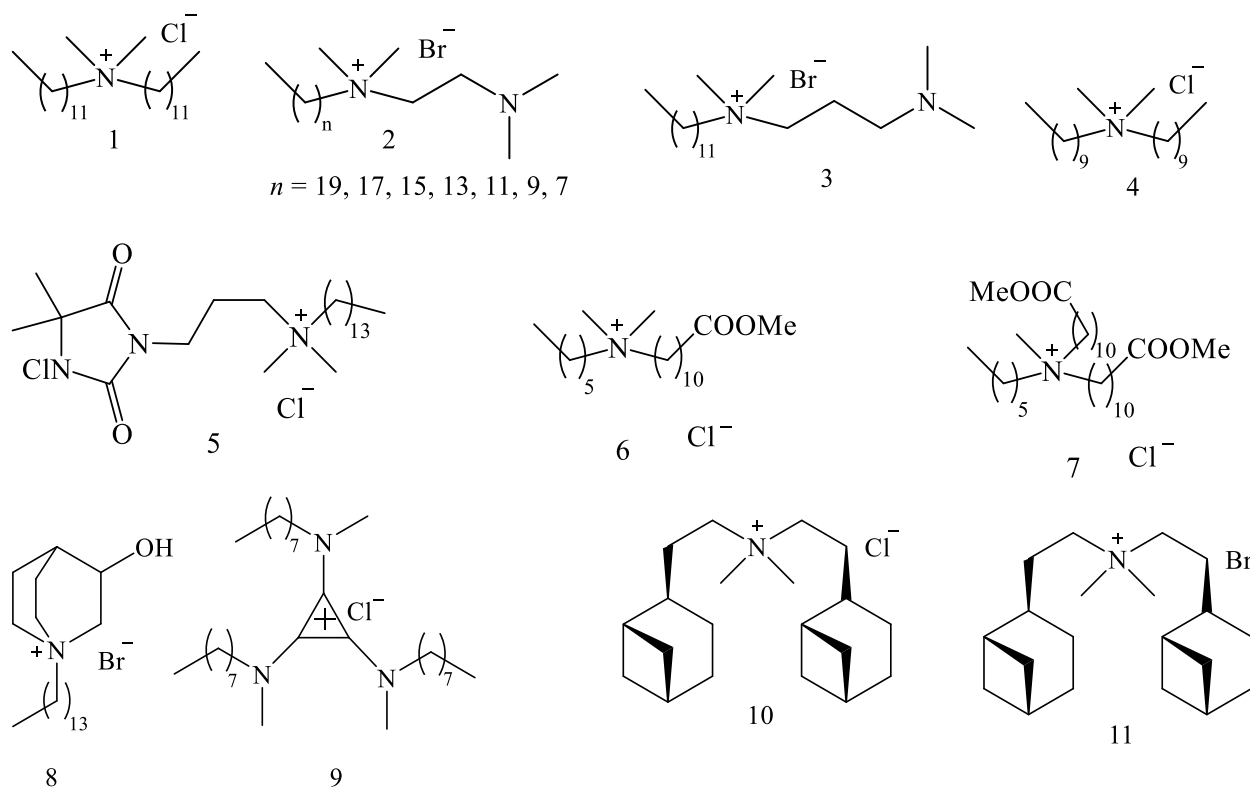
Monokvaterni amonijevi spojevi s dugim alkilnim lancima već su dugo prepoznati kao učinkoviti antimikrobni agensi, a jedan od najpoznatijih predstavnika ove skupine je benzalkonijev klorid (BAC), koji se koristi u medicini i industriji kao antiseptik i dezinfekcijsko sredstvo širokog djelovanja.³⁴ Iako su učinci ovih spojeva dobro dokumentirani, s razvojem novih derivata nastoji se poboljšati njihova učinkovitost, selektivnost i smanjiti potencijal za razvoj rezistencije. Do posljednjih nekoliko godina, većina istraživanja fokusirala se na optimizaciju strukture alkilnih lanaca i uvođenje različitih funkcionalnih skupina u molekulu QACs. U nastavku slijedi pregled važnijih studija objavljenih od 2014. godine koje donose nove pristupe u sintezi i evaluaciji antibakterijske aktivnosti monokvaternih amonijevih spojeva s alkilnim lancima.

Godine 2014. Jennings i sur. objavili su istraživanje koje se bavilo antibakterijskim djelovanjem analoga benzalkonijevog klorida (BAC) spoj 1, pri čemu su pokazali širok spektar antibakterijske aktivnosti protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, uključujući *S. aureus* i druge patogene, slika 10.⁴² Uslijedilo je istraživanje Blacka i sur., koji su sintetizirali alkilirane derivate TMEDA-e spoj 2.⁴³ Ovi spojevi pokazali su značajnu aktivnost protiv *S. aureus* s minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) od 1 μ M, što sugerira njihovu potencijalnu primjenu u liječenju bakterijskih infekcija. Istraživanje antibakterijske učinkovitosti kvaternih amonijevih spojeva 3 i 4, koje je objavila ista istraživačka skupina, također su pokazala snažnu aktivnost protiv *S. aureus* (MRSA) soja USA300-0114, koji nosi gen za otpornost na QACs, s MIK vrijednosti od 4 μ M.⁴⁴ Ovi rezultati potvrđuju učinkovitost QACs borbi protiv multirezistentnih sojeva bakterija. Nadalje, kako bi se smanjila mogućnost razvoja otpornosti na ove spojeve, Ning i sur. uveli su pozitivni naboj u strukturu *N*-kloramina, što je dovelo do značajne 7,55 log redukcije MRSA u samo 5 minuta za spoj 5.⁴⁵ Ovaj pristup, uvođenjem dodatnog pozitivnog naboja koji povećava afinitet spoja prema negativno nabijenim bakterijskim membranama, pokazuje mogućnost značajnog povećanja učinkovitosti i istovremenog smanjenja rizika od razvoja otpornosti.

U 2016. godini, Yasa i suradnici istraživali su monoesterne i diesterne QACs temeljene na 11-bromundekanskoj kiselini, (spojevi 6 i 7), koji su pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost protiv *M. luteus* MTCC 2470, s MIK od 1,9 μ g/mL, što upućuje na njihov potencijal u borbi protiv bakterijskih infekcija.⁴⁶

Bazina i sur. (2019) predstavili su nove QACs temeljene na kinuklidin-3-olu, a spoj 8 iz ove skupine pokazao je izuzetnu antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, MRSA-e, *E. faecalis*, *S. pyogenes* i *L. monocytogenes* s MIK vrijednostima u rasponu od 0,06 do 3,9 μ g/mL, što ga čini vrlo obećavajućim kandidatom za daljnja istraživanja i razvoj.¹⁵ Istraživanje Belaya i sur. (2020.) odnosilo se na asimetrični derivat trialkilamina ciklopropenija, spoj 9, koji je pokazao antibakterijsku aktivnost protiv *S. epidermidis* s MIK od 3,7 μ M.⁴⁷ Ovaj spoj potvrđuje potencijal ciklopropenijskih derivata u antibakterijskoj terapiji. Konačno, Zhang i sur. (2021.) sintetizirali su β -pinenske QACs te su procijenili njihovu aktivnost protiv *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa*. Spoj 10 pokazao je širok spektar aktivnosti s MIK vrijednostima u rasponu od 0,625 do 2,5 μ g/mL, dok su istraživanja pokazala da halogenidni ioni (Cl, I) značajno utječu na antibakterijsku učinkovitost spojeva.⁴⁸ Ova istraživanja ističu značajan napredak u razvoju

novih antibakterijskih agensa temeljenih na monokvaternim amonijevim spojevima s dugim alkilnim lancima. Kroz racionalni dizajn i strukturne modifikacije – poput optimizacije duljine alkilnog lanca, uvođenja dodatnog pozitivnog naboja i korištenja različitih funkcionalnih skupina – postignuta je poboljšana učinkovitost protiv širokog spektra bakterija, uključujući i multirezistentne sojeve. Ovi rezultati potvrđuju potencijal QACs u borbi protiv rezistencije te pružaju obećavajuće mogućnosti za njihovu daljnju primjenu u medicinskim terapijama.



Slika 10. Kemijski prikaz struktura monoQACs s alkilnim lancima (1-11).¹

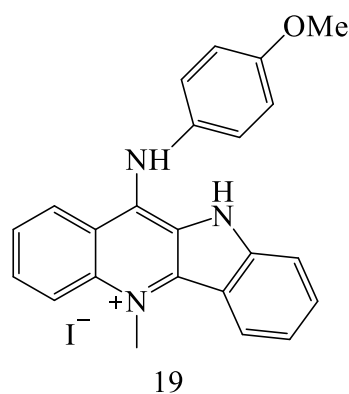
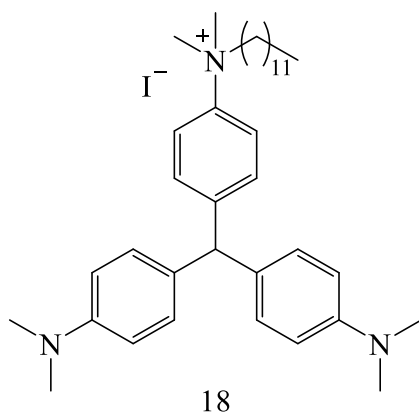
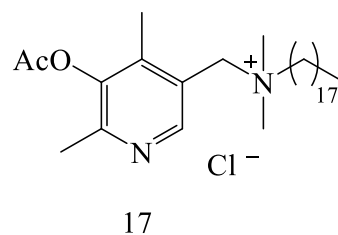
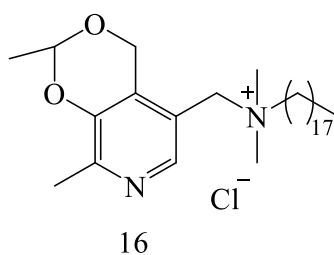
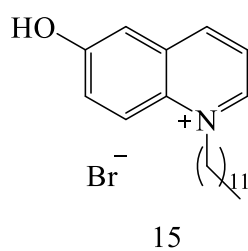
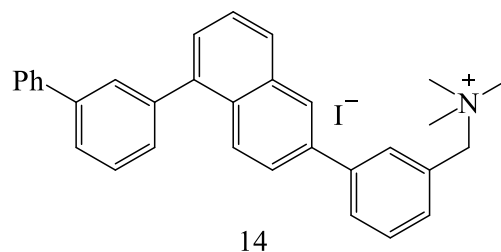
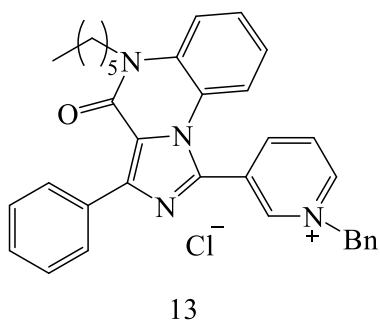
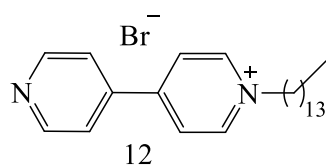
Od 2012. godine, značajan istraživački interes usmjeren je na sintezu i evaluaciju monoQACs koje sadrže aromatske ili heteroaromatske okosnice. Takvi spojevi pokazuju poboljšana antibakterijska svojstva, dijelom zbog mogućnosti specifičnih interakcija s biološkim metama, poput membranskih komponenti ili intracelularnih enzima. Aromatski sustavi u QACs, bilo kao dio centralne okosnice ili kao supstituenti, često doprinose boljoj lipofilnosti, ciljanju specifičnih proteina i poboljšanoj staničnoj penetraciji. Istraživanja ovih spojeva često se oslanjaju na strukturno-aktivnosne odnose (SAR) kako bi se razjasnilo koji strukturni elementi najviše doprinose antibakterijskoj aktivnosti. U tom kontekstu, Grenier i sur. (2012.)

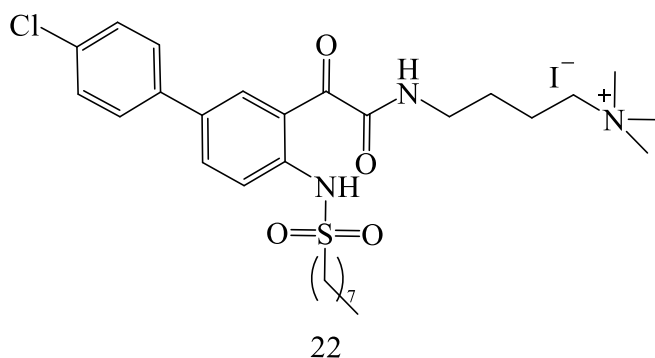
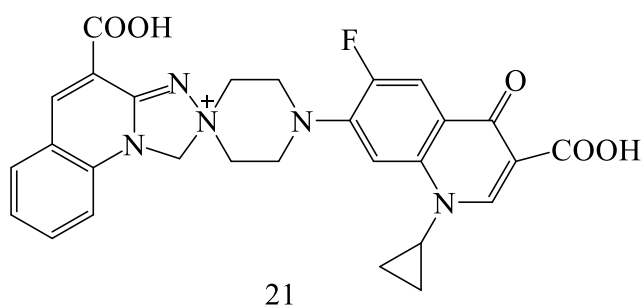
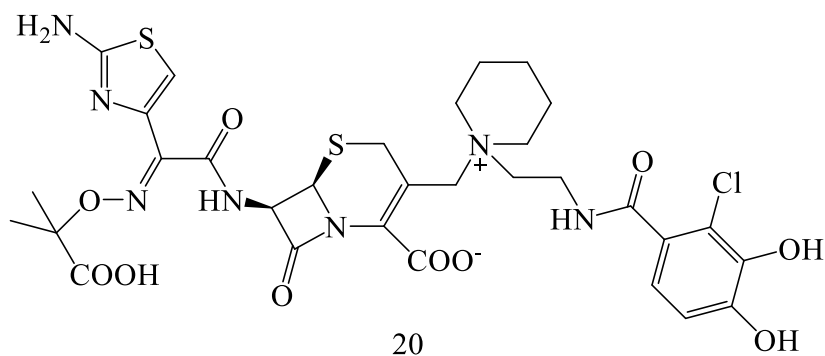
sintetizirali su niz QACs temeljenih na 4,4'-bipiridinskoj jezgri, pri čemu je spoj 12 pokazao umjerenu antibakterijsku aktivnost, uključujući učinkovitost protiv *S. aureus*, *E. faecalis* i *E. coli*, s minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) od 8 μ M, slika 11.⁴⁹ Ovi rezultati upućuju na to da simetrična bipiridinska struktura može igrati ulogu u interakciji s bakterijskim ciljevima, vjerojatno putem elektrostatskih i π - π interakcija. Godine 2013., Kalinin i sur. sintetizirali su QACs na bazi imidazo[1,5- α]kinoksalina (spoj 13), koji su pokazali izraženu aktivnost protiv *S. aureus* (MIK=0,97 μ g/mL), što sugerira da specifična heterociklička struktura može poboljšati afinitet prema bakterijskim ciljevima. Zhang i sur. izvijestili su o antibakterijskoj aktivnosti derivata 1,6-difenilnaftalena (spoj 14), usmjerenih na FtsZ protein, s MIK-om od 1 μ g/mL protiv MRSA soja.^{50,51} Ova aktivnost pripisana je sposobnosti spoja da inducira polimerizaciju FtsZ proteina, ključnog za bakterijsku diobu, bez utjecaja na mamalijski tubulin, što ukazuje na selektivnost prema bakterijskim stanicama. Ova istraživanja jasno pokazuju da ugradnja specifičnih aromatskih ili heteroaromatskih sustava unutar QAC struktura može rezultirati poboljšanom selektivnošću i potentnošću. SAR analize omogućile su identificiranje strukturnih značajki koje doprinose aktivnosti, uključujući prirodu aromatske jezgre, raspored kationa i prisutnost funkcionalnih skupina koje povećavaju interakcije s ciljanim bakterijskim proteinima.

Istraživanja su nastavila evoluirati kroz godine. Malinak i sur. (2014) izvijestili su o aktivnostima 6-hidroksikinolinijevih soli spoj 15 protiv *S. aureus* i *E. coli* s MIK vrijednostima od 0,49 μ g/mL, odnosno 1,95 μ g/mL.⁵² Kasnije, Kayumov i sur. (2015) objavili su biocidnu aktivnost spoja 16 protiv planktonskih bakterija i bakterija ugrađenih u biofilm, *S. aureus* i *S. epidermidis*.⁵³ U 2016. godini, istraživanje Shtyrlina i sur. o QACs temeljenim na 4-deoksipiridoksinu spoj 17 pokazalo je obećavajuće rezultate protiv kliničkih patogena, *S. aureus*, MRSA, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* s MIK-om od 1 μ g/mL.⁵⁴ Forman i sur. iz 2016. izvijestili su o antibakterijskom djelovanju monokvaternih QACs temeljenih na kristal violetu spoj 18, koji su pokazali potencijalnu aktivnost s MIK-om od 0,25 μ M protiv *S. aureus* i MRSA-e.²⁴

Povećanje antibakterijske otpornosti, osobito među multirezistentnim sojevima poput MRSA i *E. coli*, dodatno je potaknulo istraživanje QACs. U 2017. godini, Sun i sur. sintetizirali su FtsZ ciljne QACs, spoj 19, koji su pokazali potencijalnu aktivnost protiv *S. aureus*, MRSA-e, *E. faecium* i *E. coli* s MIK-om u rasponu od 2 do 6 μ g/mL.⁵⁵ Kroz 2018. i 2019. godinu, izvješća

o QACs temeljenim na cefiderokolu spoj 20, fluorokinolonima spoj 21 i bifenilglioksamidima spoj 22 nastavljaju pokazivati obećanje, s MIK-ovima u rasponu od 0,03 do 0,063 µg/mL za određene sojeve *S. pyogenes* i *P. vulgaris*.^{29,56–59}





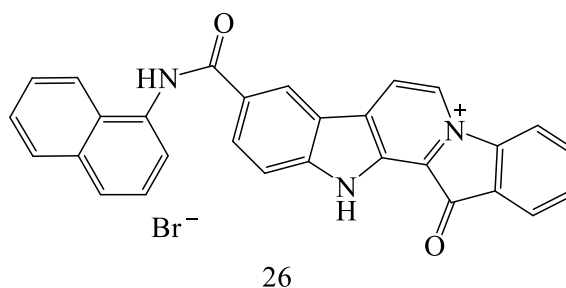
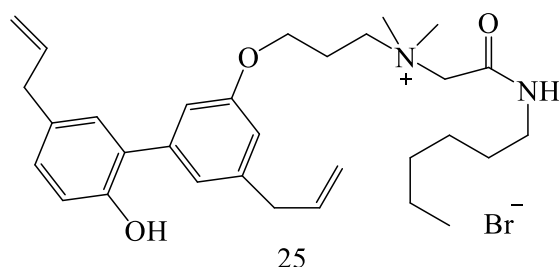
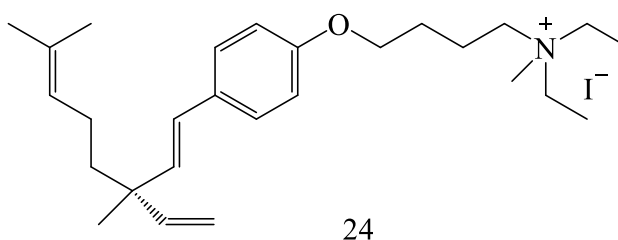
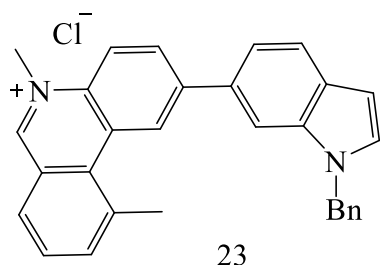
Slika 11. Kemijski prikaz struktura monoQACs s aromatskim dijelom (12-22).¹

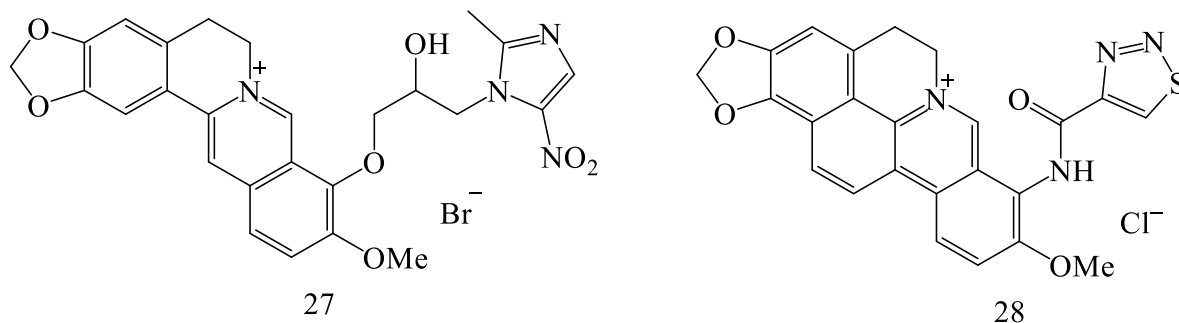
Nadalje, istraživanja u 2020. i 2021. godini usmjerena su na sintezu QACs na bazi indolil-5-metilfenantridija spoj 23 i drugih strukturnih okvira poput bakuchiola spoj 24 i magnolola spoj 25, koji su pokazali obećavajuće rezultate protiv *MRSA* i *S. aureus* (MIK od 4 µg/mL za spojeve 24 i 25), slika 12.^{51,60,61} U najnovijim istraživanjima iz 2022. godine, neki derivati faskaplisina spoj 26 i berberina spoj 27 i 28 pokazali su visoku aktivnost protiv *MRSA* s MIK vrijednostima od 0,098 µg/mL, dok je berberinov derivat pokazao dobru aktivnost protiv VISA

(*Staphylococcus aureus* s posrednom otpornošću na vankomicin) s MIK vrijednostima u rasponu od 2 do 16 µg/mL.^{62–64}

Sinteza monoQACs koje sadrže aromatske ili heteroaromske okosnice pokazala se izuzetno plodnim pristupom u razvoju novih antimikrobnih agensa. Ugradnja aromatskih sustava, bilo u centralnu jezgru ili kao supstituenata, omogućila je poboljšanu lipofilnost, bolju staničnu penetraciju i specifične interakcije s biološkim metama, uključujući membranske strukture i ključne enzime poput FtsZ proteina. Rezultati brojnih istraživanja, potkrijepljeni SAR analizama, potvrđuju važnost racionalnog dizajna i selekcije funkcionalnih skupina koje doprinose selektivnosti i potentnosti ovih spojeva.

Ova kontinuirana istraživanja ističu rastući potencijal QACs u borbi protiv antibakterijske rezistencije, čime se otvara mogućnost za razvoj novih terapijskih pristupa u liječenju infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama. Sustavna optimizacija strukture, usmjerena na specifične ciljeve i smanjenje toksičnosti prema eukariotskim stanicama, ključna je za translaciju ovih spojeva iz laboratorijskih ispitivanja u kliničku primjenu.





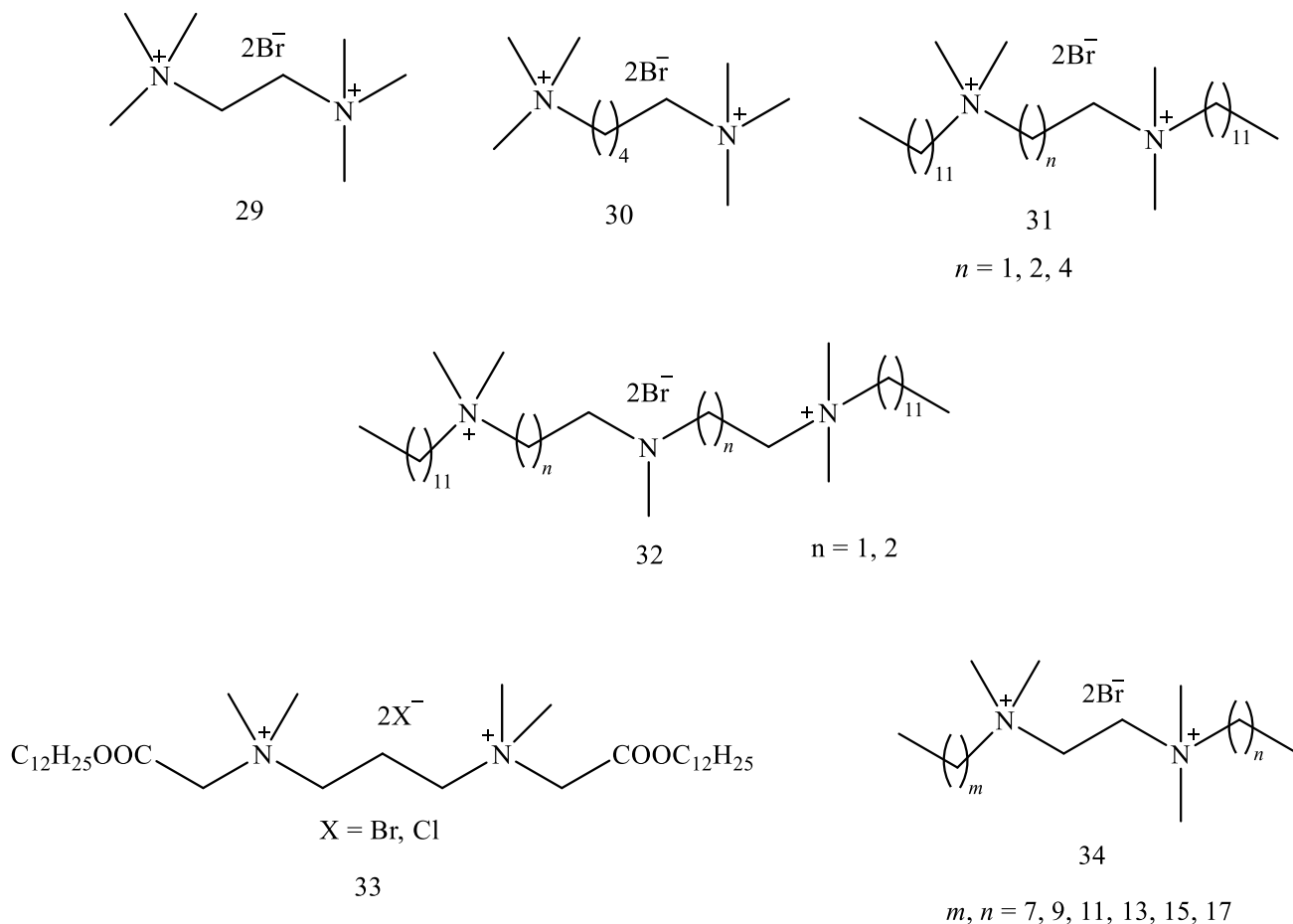
Slika 12. Kemijski prikaz struktura monoQACs s aromatskim dijelom (23-28).¹

Biskvaterni amonijevi spojevi (bisQACs) predstavljaju strukturalno poboljšane derivate klasičnih monokvaternih QACs. Sadrže dvije pozitivno nabijene (kationske) skupine koje omogućuju jaču i stabilniju interakciju s negativno nabijenim komponentama bakterijske membrane. Ova dvojakost povećava sposobnost destabilizacije membrane, što rezultira učinkovitijim membranolitičkim djelovanjem i često nižim minimalnim inhibitornih koncentracijama (MIK). Upravo zbog toga bisQACs privlače pažnju kao potencijalno snažniji antibakterijski agensi u borbi protiv rezistentnih bakterijskih sojeva.

Jennings i sur. (2014.) sintetizirali su niz biskvaternih amonijevih spojeva (bisQACs) (spojevi 29–32), pri čemu su posebnu pozornost posvetili ulozi alkilnih bočnih lanaca u njihovoj antibakterijskoj aktivnosti, slika 13. Spoj 32 pokazao je izrazitu inhibicijsku aktivnost protiv *E. faecalis* i *E. coli*, pri čemu je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) iznosila manje od 0,25 μM .⁴²

Oblak i sur. (2014) istraživali su bioaktivnost određenih derivata kvaternih amonijevih spojeva temeljenih na TMPG-u (*N,N,N',N'*-tetrametil-1,3-propandiamin), pri čemu su identificirali ključne strukturne značajke koje utječu na njihovu učinkovitost. Zanimljivo je da su različiti anioni (bromidi i kloridi) pokazali diferencijalnu učinkovitost protiv specifičnih bakterijskih sojeva, što je vidljivo kod spoja 33.⁶⁵

Asimetrično alkilirani derivati TMEDA, uključujući spoj 34, koje su sintetizirali Black i sur., iskazali su potencijalnu antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, s MIK vrijednostima u rasponu od 1 do 32 μM .⁴³



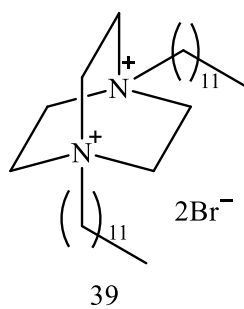
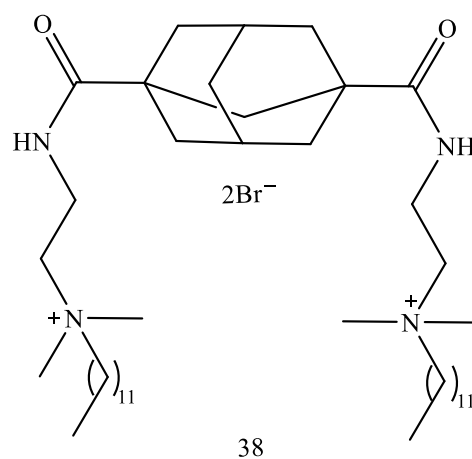
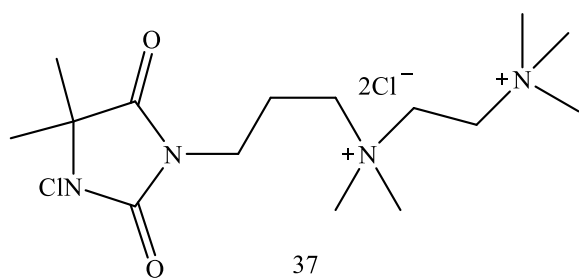
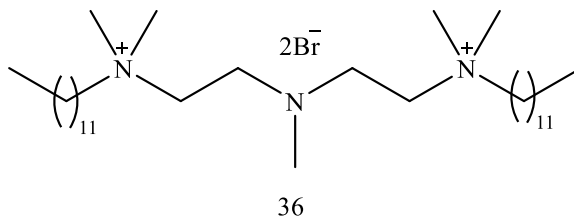
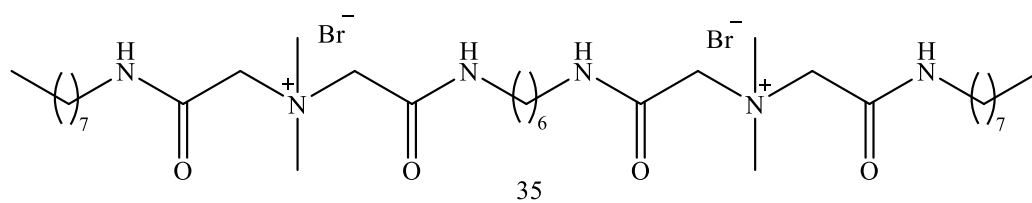
Slika 13. Kemijski prikaz struktura bisQACs s alkilnim lancima (29-34).¹

Hoque i sur. (2015) izvijestili su o seriji kvaternih amonijevih spojeva s četiri nepeptidne amidne skupine i varijabilnim hidrofobno-hidrofilnim (amfifilnim) svojstvima. Ovi spojevi pokazali su visoku aktivnost protiv bakterijskih sojeva otpornih na antibiotike, uključujući meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA), vankomicin-rezistentni *Enterococcus faecium* (VRE) i *K. pneumoniae* rezistentnu na β -laktame, pri čemu je najniža MIK vrijednost iznosila 1 $\mu\text{g/mL}$, spoj 35, slika 14.³ Jennings i sur. (2015) dodatno su istražili biskvaterne QACs, pri čemu je spoj

36 pokazao izraženu aktivnost protiv *MRSA* sojeva rezistentnih na konvencionalne QACs, s MIK vrijednošću od 1 μM .⁴⁴ Posebno su značajni QACs biskationi temeljeni na *N*-kloraminima, poput spoja 37, koji su u eksperimentalnim uvjetima postigli 99,56% (2,36 log) redukciju *MRSA* populacije unutar 60 minuta tretmana.⁴⁵ Fu i sur. (2016) izvijestili su o antibakterijskoj aktivnosti biskvaternih QACs izvedenih iz 1,3-adamantandikarboksilne kiseline.⁶⁶ Spojevi iz ove serije, spoj 38, pokazali su selektivnu aktivnost protiv različitih bakterijskih vrsta, pri čemu su MIK vrijednosti iznosile 2,3 μM za *S. aureus*, 9,4 μM za *E. coli*, 2,3 μM za *P. aeruginosa* te 0,1 μM za *V. parahaemolyticus*. Kontos i sur. (2019) sintetizirali su biskvaterne QACs temeljene na DABCO strukturi, koji su pokazali snažnu antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *MRSA-e*, pri čemu su zabilježene MIK vrijednosti dosežale minimalno 0,25 μM (spoj 39).²²

Biskvaterni amonijevi spojevi (bisQACs) predstavljaju značajan iskorak u dizajnu antimikrobnih sredstava, zahvaljujući svojoj dvojakosti kationskih centara koji omogućuju snažnije interakcije s bakterijskim membranama. Ova strukturna karakteristika doprinosi učinkovitijem membranolitičkom djelovanju, što se očituje kroz niže MIK vrijednosti u usporedbi s klasičnim monokvaternim QACs.

Kroz niz istraživanja provedenih u posljednjem desetljeću, bisQACs su pokazali visoku potentnost protiv različitih patogenih sojeva, uključujući one rezistentne na konvencionalne antibiotike i monokvaterne QACs. Strukturne modifikacije — poput duljine i rasporeda alkilnih lanaca, prirode anionskih partnera te prisutnosti funkcionalnih skupina poput amidnih ili kloraminskih jedinica — pokazale su se ključnima za optimizaciju aktivnosti. Ova istraživanja ne samo da potvrđuju važnost racionalnog dizajna bisQACs u ciljanju bakterijskih membrana, već i ističu njihov rastući potencijal u borbi protiv multirezistentnih bakterijskih infekcija. Kao takvi, bisQACs predstavljaju obećavajuću klasu spojeva za razvoj budućih antimikrobnih terapija, osobito u kontekstu globalne prijetnje bakterijske rezistencije.



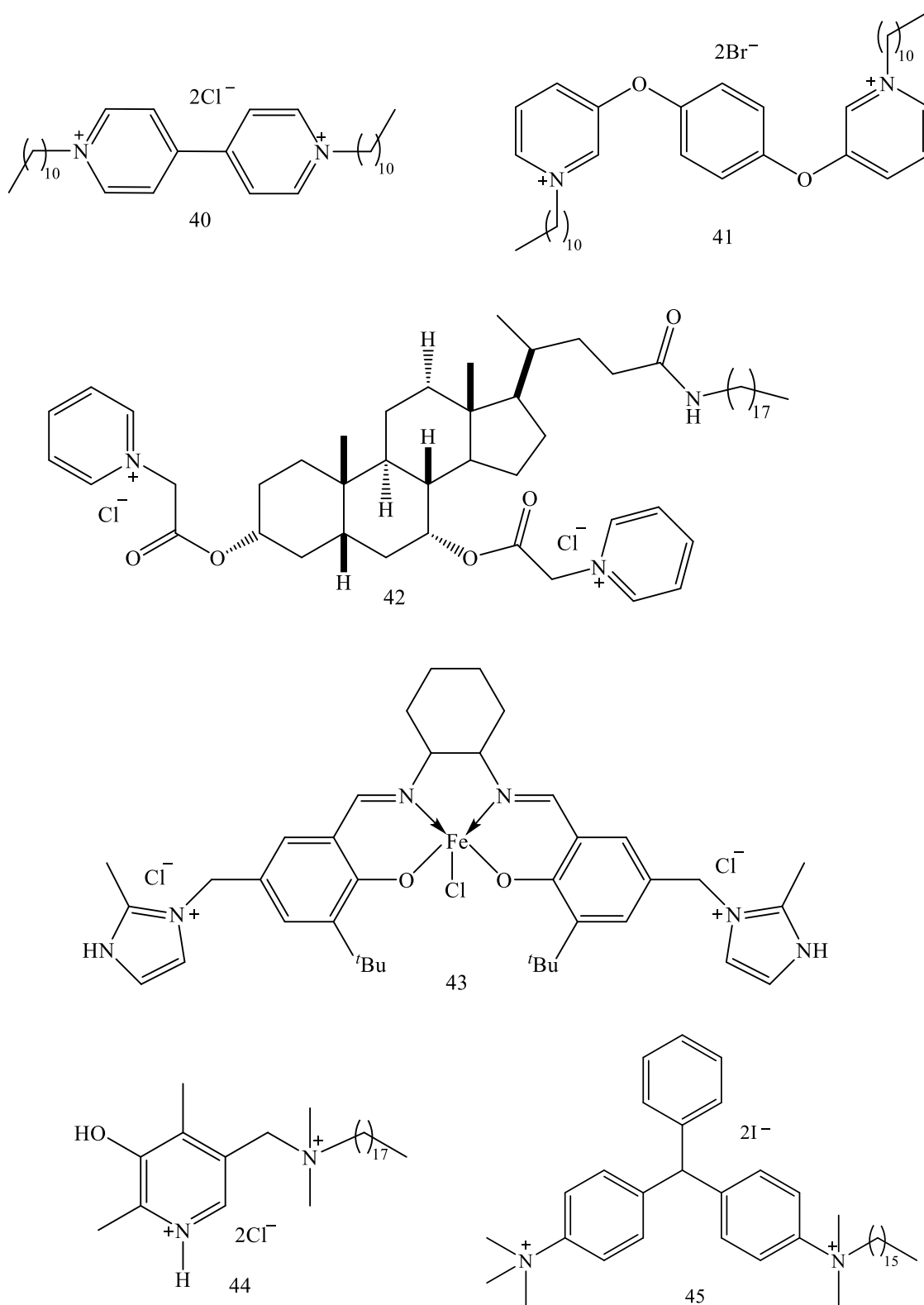
Slika 14. Kemijski prikaz struktura bisQACs s alkilnim lancima (35-39).¹

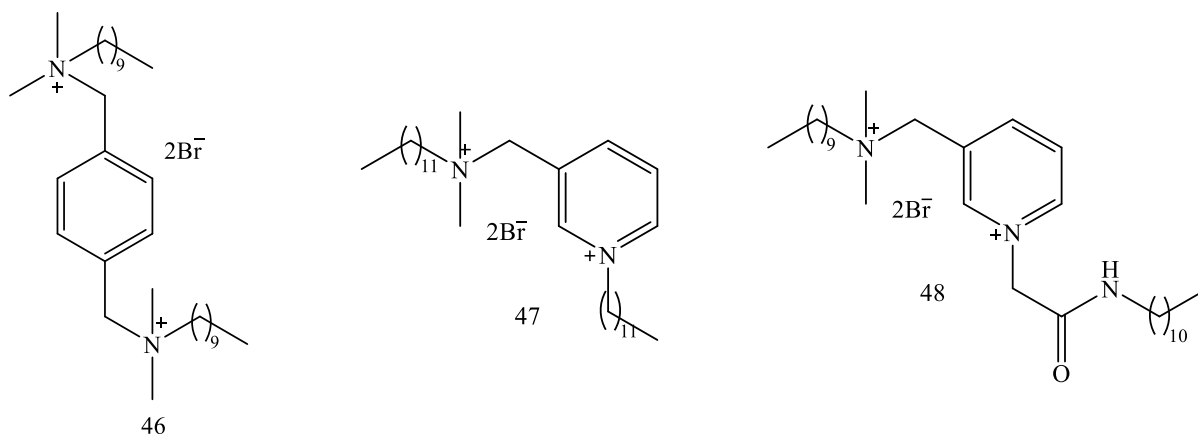
Aromatski biskvaterni amonijevi spojevi (bisQACs) predstavljaju značajan korak naprijed u razvoju učinkovitijih antimikrobnih sredstava, osobito u kontekstu rastuće bakterijske rezistencije. Za razliku od konvencionalnih monokvaternih QACs, bisQACs sadrže dvije kationske skupine povezane fleksibilnim ili krutim aromatskim poveznicaima, što im omogućuje višestruku interakciju s bakterijskim staničnim membranama i potencijalno povećanu stabilnost, selektivnost i učinkovitost. Njihova strukturalna raznolikost – uključujući različite tipove aromatskih jezgri, duljine alkilnih lanaca i prisutnost funkcionalnih skupina poput amidnih veza – omogućuje fino podešavanje biološke aktivnosti i toksičnosti. U ovom poglavlju prikazana su recentna istraživanja koja potvrđuju iznimnu antibakterijsku aktivnost niza aromatskih bisQACs protiv širokog spektra bakterija, uključujući rezistentne sojeve poput *MRSA* i *P. aeruginosa*, te se naglašava utjecaj strukture na djelotvornost i sigurnost ovih spojeva, slika 13.

Godine 2012. Grenier i sur. izvijestili su o antibakterijskoj aktivnosti biskvaternih QACs, pri čemu su spojevi na bazi bipiridina, spoj 40, pokazali superiorno djelovanje u odnosu na monokvaterne QACs, spoj 12, slika 15 i slika 11.⁴⁹ Nadalje, Frolov i sur. sintetizirali su fenil-bazirane biskvaterne QACs, koji su demonstrirali antibakterijsku aktivnost s MIK vrijednosti nižom od 0,25 µg/mL, spoj 41.⁶⁷

Godine 2013. Ye i sur. sintetizirali su seriju QACs izvedenih iz dugolančanih alkilnih derivata žučnih kiselina, među kojima je spoj 42 pokazao značajnu aktivnost protiv *E. coli* s MIK vrijednosti od 0,8 µg/mL.⁶⁸ Iste godine, Elshaarawy i sur. istraživali su imidazolijske QACs, koji su iskazali umjereno antibakterijsko djelovanje, spoj 43.⁶⁹ Također, Shtyrin i sur. objavili su rezultate istraživanja spoja 44, derivata 4-deoksipiridoksina, koji je pokazao djelotvornost protiv kliničkih izolata s MIK vrijednosti od 0,5 µg/mL.⁷⁰

Forman i sur. izvijestili su o antibakterijskoj aktivnosti biskvaternih QACs na temelju kristalno ljubičaste boje, s MIK vrijednosti <0,25 µg/mL (spoj 45).²⁴ Godine 2017. Brycki i sur. sintetizirali su QACs s aromatskim poveznicaima, koji su iskazali značajnu aktivnost protiv *S. aureus*, s MIK vrijednosti od 6,1 µM, spoj 46.⁷¹ Schallenhammer i sur. objavili su rezultate istraživanja anti-*MRSA* aktivnosti biskationskog spoja 47, koji je postigao MIK vrijednost od svega 1 µM.⁷² Dodatno, integracija amidnih veza unutar molekularne strukture ovih spojeva rezultirala je očuvanjem antibakterijske aktivnosti spoj 48.⁷²





Slika 15. Kemijski prikaz struktura bisQACs s aromatskim dijelom (40-48).¹

Murakami i sur. izvijestili su o antibakterijskoj aktivnosti spoja 49, 4,40-(α,ω -heksametilenditio)bis(1-oktilpiridinijevog bromida), protiv 20 kliničkih sojeva *P. aeruginosa*, pri čemu je MIK varirao u rasponu od 8 do 32 $\mu\text{g/mL}$, slika 16.⁷³ Al-Khalifa i sur. istraživali su biskvaterne derivate na bazi piridina s izraženim djelovanjem protiv *MRSA-e*, pri čemu su zabilježili MIK vrijednosti od 0,25 μM , spoj 50.⁷⁴

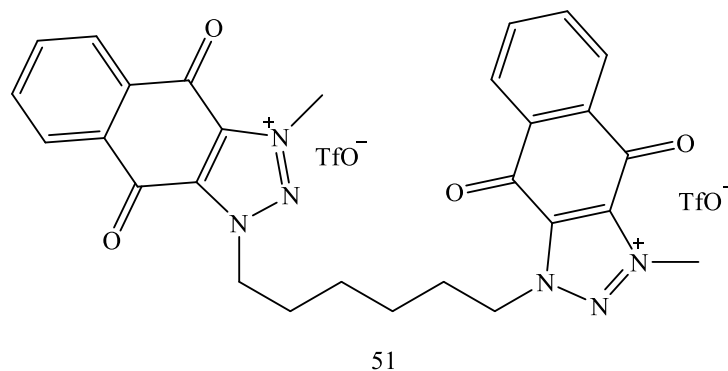
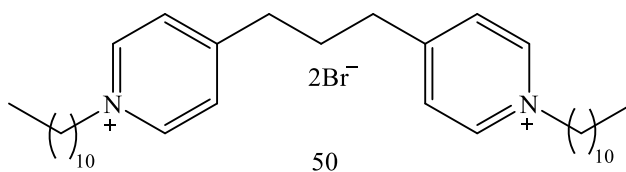
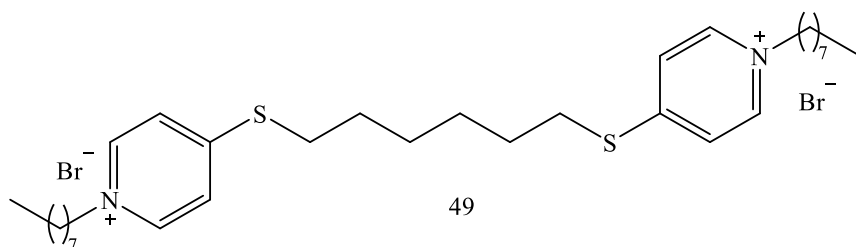
Shrestha i sur. izvijestili su o antibakterijskoj aktivnosti dimernog kationskog triazolijskog spoja 51 na bazi kinona, koji je selektivno inhibirao rast *S. aureus* s MIK vrijednosti od 0,125 $\mu\text{g/mL}$.⁷⁵ Godine 2019. Vereščagin i sur. sintetizirali su biskvaterne QACs s bifenilnim razmaknicima, pri čemu su spojevi pokazali značajnu aktivnost protiv *MRSA*, s MIK $<0,25 \mu\text{g/mL}$, spoj 52.⁷⁶ Thomas i sur. sintetizirali su bisimidazolijske QACs, koji su iskazali antibakterijsko djelovanje, s MIK vrijednosti u rasponu od 0,25 do 8 $\mu\text{g/mL}$, spoj 53.⁷⁷ Shtyrlin i sur. objavili su rezultate istraživanja biskvaternih QACs izvedenih iz piridoksina, pri čemu je spoj 54 pokazao antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*, s MIK u rasponu od 1 do 32 $\mu\text{g/mL}$, uz nisku toksičnost ($\text{LD}_{50}=1705 \text{ mg/kg}$).⁵⁴

Leitgeb i sur. izvijestili su o dialkil piridinijevim bisQACs, koji su iskazali obećavajuću aktivnost protiv *MRSA-e* s MIK od 1 μM , spoj 55.²¹ Guo i sur. sintetizirali su biskvaterne QACs izvedene iz honokiola, koji su pokazali snažnu aktivnost protiv kliničkih izolata *MRSA-e* s MIK od 0,5–1 $\mu\text{g/mL}$, spoj 56.⁶¹ Vereščagin i sur. dodatno su modificirali spojeve temeljene na

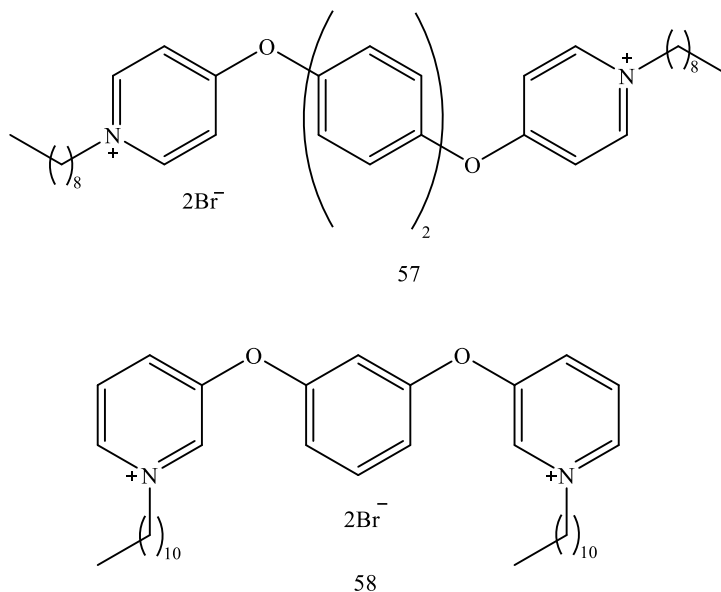
strukturi spoja 52, što je rezultiralo superiornom antibakterijskom aktivnošću s MIK <0,25 µg/mL protiv pet sojeva patogenih bakterija, spoj 57.⁷⁸

Frolov i sur. dalje su istraživali biskvaterne QACs na bazi fenila, potvrđujući njihovu iznimnu antibakterijsku aktivnost s MIK vrijednosti <0,25 µg/mL, spoj 58.⁶⁷

Zaključno, brojna istraživanja provedena tijekom posljednjeg desetljeća ukazuju na velik potencijal aromatskih bisQACs kao snažnih antibakterijskih agensa. Uvođenje aromatskih jezgri i kationskih centara unutar strukture rezultiralo je spojevima koji često pokazuju znatno niže MIK vrijednosti u odnosu na njihove monokvaterne analoge.⁷⁹ Aromatske strukture, poput piridina, bifenila, fenila ili imidazola, omogućuju stabilizaciju interakcije s bakterijskom membranom, dok biskationska priroda doprinosi povećanoj membranolitičkoj aktivnosti. Mnogi spojevi pokazali su selektivnu aktivnost protiv patogenih i rezistentnih sojeva, uključujući *MRSA* i *VRE*, uz nisku citotoksičnost, što ih čini posebno relevantnima u kontekstu rastuće antimikrobne rezistencije. Ova istraživanja potvrđuju važnost racionalnog dizajna bisQACs i otvaraju mogućnosti za daljnji razvoj novih, učinkovitih antimikrobnih sredstava temeljenih na aromatskim biskvaternim strukturama.







Slika 16. Kemijski prikaz struktura bisQACs s aromatskim dijelom (49-58).¹

Polikvaterni amonijevi spojevi s tri ili više kationskih centara, poznati kao triskationski i tetrakationski QACs, predstavljaju novu generaciju molekula dizajniranih za učinkovitu borbu protiv bakterijskih patogena, uključujući rezistentne i biofilm-formirajuće sojeve. Njihova struktura, koja uključuje više pozitivnih naboja te često dugačke alkilne lance, omogućuje višestruke interakcije s bakterijskom membranom, što rezultira pojačanim baktericidnim učinkom. Osim što učinkovito inhibiraju planktonske stanice, mnogi od ovih spojeva pokazuju sposobnost penetracije i eradikacije biofilмова – oblika bakterija koji su posebno otporni na konvencionalne antibiotike. Ovaj dio disertacije prikazuje relevantna istraživanja koja potvrđuju visoku učinkovitost polikvaternih QACs, s posebnim naglaskom na njihovu aktivnost protiv rezistentnih sojeva poput *MRSA* i problematičnih Gram-negativnih bakterija, slika 14.

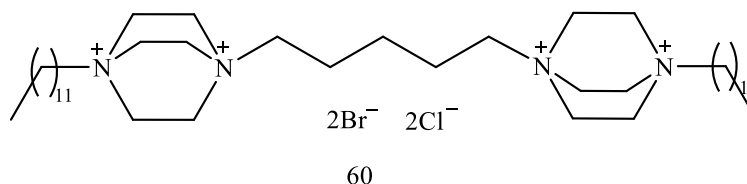
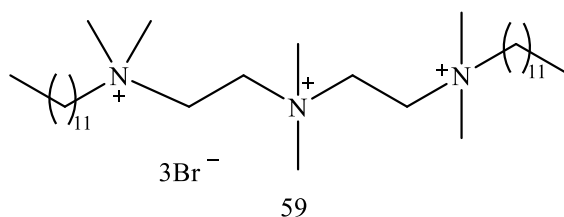
Triskationski QACs sintetizirani od strane Jenningsa i sur., spoj 59, pokazali su iznimnu antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*, pri čemu su MIK vrijednosti iznosile <0,25 μM, <0,25 μM, 0,5 μM i 1 μM, redom, slika 17. Ove vrijednosti MIK-a ukazuju na visok stupanj potentnosti spoja, dok je minimalna baktericidna eradikacijska koncentracija (MBEC) protiv biofilмова *S. aureus* iznosila 50 μM, što potvrđuje njegovu učinkovitost u eradikaciji biofilмова.⁴²

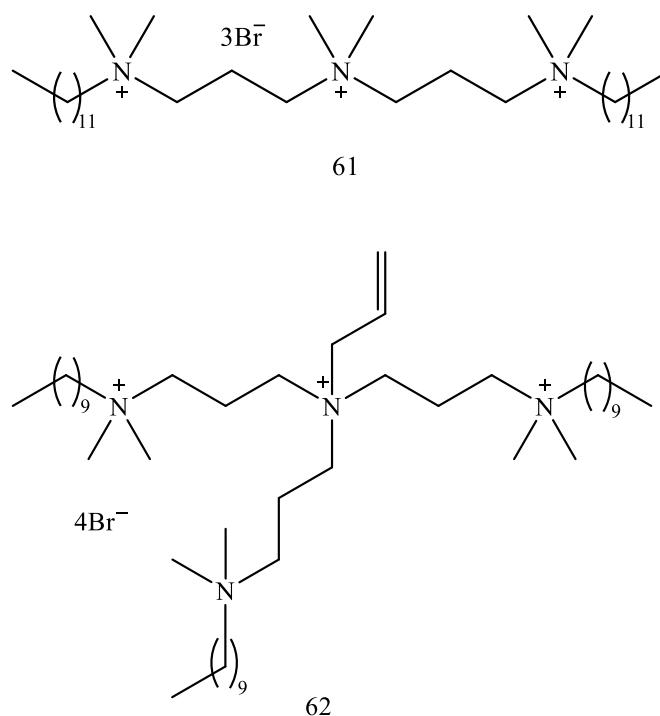
Godine 2015. sintetizirana je serija QACs baziranih na DABCO, koji su pokazali izuzetno niske MIK vrijednosti ($<1,6 \mu\text{g/mL}$) te snažnu baktericidnu aktivnost protiv *P. aeruginosa*. Među njima, spoj 60 pokazao je brzi baktericidni učinak, eliminirajući 100 % početnog inokuluma bakterija unutar 2,5 sata pri koncentraciji od $10 \mu\text{g/mL}$.⁸⁰

Također, 2015. godine određeni triskationski spojevi, poput spoja 61, demonstrirali su značajnu aktivnost protiv rezistentnog meticilin-rezistentnog *S. aureusa* (MRSA), s MIK vrijednošću od $0,5 \mu\text{M}$.⁴⁴

Daljnji razvoj ovih struktura rezultirao je sintezom nekoliko tris- i tetrakationskih QACs 2016. godine, koje su Forman i sur. istražili, pri čemu je spoj 62 pokazao izrazito potentnu aktivnost protiv rezistentnog MRSA soja. Najniža zabilježena MIK vrijednost iznosila je $0,25 \mu\text{M}$, dok je MBEC za eradikaciju biofilma iznosio $25 \mu\text{M}$, što potvrđuje visoku učinkovitost ovih spojeva u prevladavanju bakterijske rezistencije.³⁹

Prikazani rezultati jasno potvrđuju da tris- i tetrakationski QACs posjeduju iznimno snažnu antibakterijsku aktivnost, uključujući učinkovitost protiv multirezistentnih sojeva i biofilma, što ih čini posebno vrijednima u kontekstu rastuće antimikrobne rezistencije. Njihova sposobnost da pri niskim koncentracijama inhibiraju rast i eradikiraju bakterije, uključujući MRSA i *P. aeruginosa*, ukazuje na potencijal ovih struktura za daljnji razvoj kao novih generacija dezinficijensa. Visoka potentnost, selektivnost i sposobnost razgradnje biofilma čine ih obećavajućom platformom za borbu protiv najotpornijih oblika bakterijskih infekcija.





Slika 17. Kemijski prikaz struktura poliQACs s alkilnim lancima (59-62).¹

Aromatski polikvaterni amonijevi spojevi (poliQACs), posebno oni s tri ili više kationskih centara, predstavljaju napredak u dizajnu antimikrobnih molekula usmjerenih na višestruku interakciju s bakterijskim staničnim membranama. Ovi spojevi, zbog svoje polikationske prirode i često aromatske okosnice, mogu istovremeno pokazivati visoku antibakterijsku potentnost i specifičnost prema patogenim mikroorganizmima, uključujući rezistentne sojeve poput *MRSA* i *P. aeruginosa*. U ovom dijelu prikazuju se rezultati istraživanja triskationskih i tetrakationskih QACs s aromatskim komponentama, njihova sposobnost djelovanja na planktonske i biofilmske stanice te utjecaj strukturnih značajki poput duljine alkilnog lanca i rasporeda naboja na njihovu biološku aktivnost i toksičnost.

Godine 2016. Forman i sur. također su izvijestili o sintezi triskationskih QACs izvedenih iz kristalno ljubičaste boje, koji su pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost protiv meticilin-rezistentnog *S. aureus* (*MRSA*) s MIK vrijednošću od 0,5 μM , spoj 63, slika 18.²⁴

U 2017. Al-Khalifa i suradnici istraživali su antibakterijska svojstva triskationskih QACs na bazi piridina, pri čemu je među analiziranim derivatima spoj 64 iskazao inhibiciju rasta *MRSA*-e pri MIK vrijednosti od 0,5 μM .⁷⁴ Nadalje, eksperimentalni podaci upućuju na to da kemijska struktura značajno utječe na biološku aktivnost ovih spojeva, pri čemu povećanje duljine alkilnih lanaca ($n = 5\text{--}9$) pozitivno korelira s poboljšanom antibakterijskom učinkovitošću. Međutim, prekomjerno produljenje alkilnih lanaca ($n = 11$) rezultiralo je značajnim smanjenjem antibakterijske aktivnosti te istovremeno povećanom hemolitičkom aktivnošću prema eritrocitima.⁷⁴

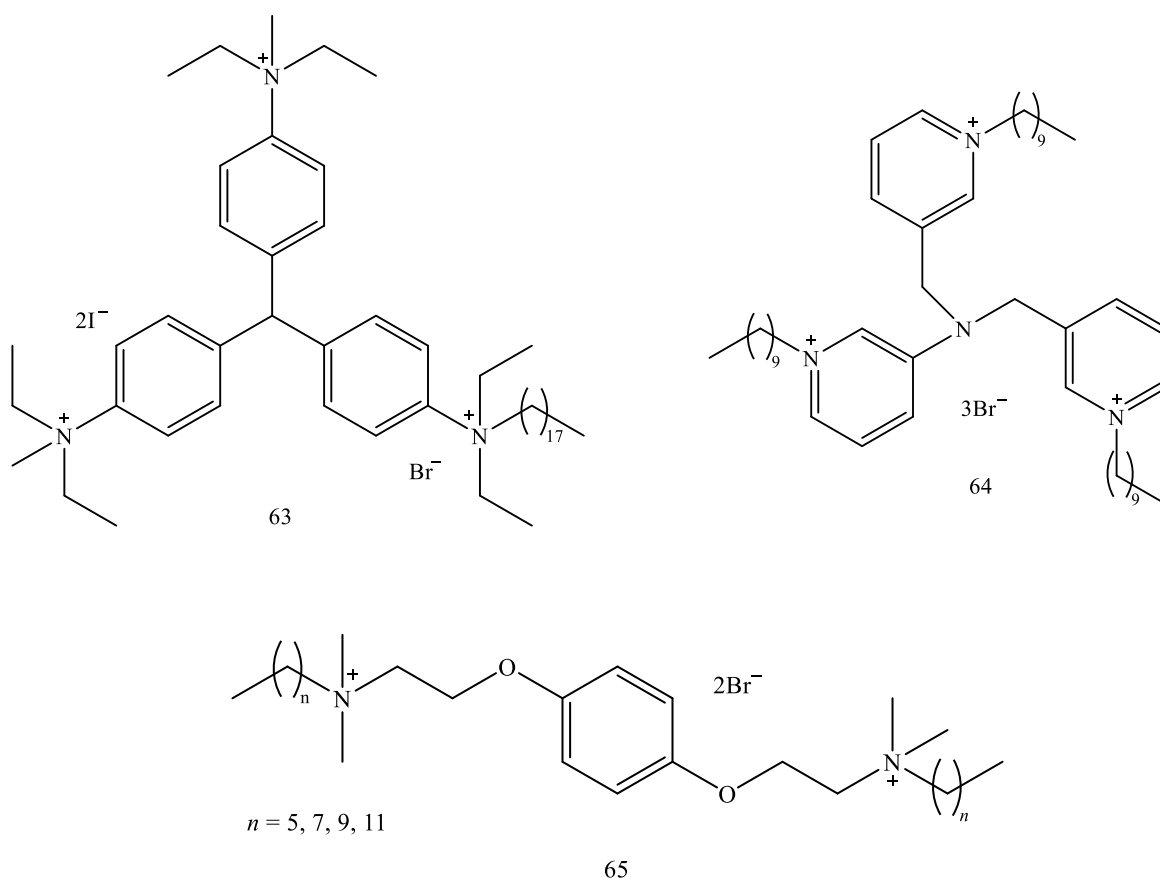
Analizom dostupnih podataka može se zaključiti da je optimalan broj hidrofobnih ugljikovih atoma između 6 i 16, čime se postiže poboljšana antibakterijska aktivnost, što je potvrđeno kod spojeva poput 13, 15, 47 i 55.⁸¹ Konkretno, duljina alkilnog lanca između osam i dvanaest ugljikovih atoma može rezultirati značajnim poboljšanjem antibakterijskog učinka. Na primjer, spoj 65 s osam odnosno deset ugljikovih atoma pokazali su 64 puta veću aktivnost protiv *S. aureus* u usporedbi sa manjim brojem ugljikovih atoma odnosno alkilnog lanca sa šest ugljikovih atoma.⁸¹

Dodatno, Hoque i sur. izvijestili su da se antibakterijska i hemolitička svojstva QACs mogu modulirati preciznim prostornim rasporedom hidrofobnih segmenata uz održavanje konstantne razine pozitivnog naboja. Usporedba QACs s izraženijom hidrofobnošću koja se proteže od pozitivnih centara (MIK = 1–4 $\mu\text{g/mL}$, HC_{50} = 60–65 $\mu\text{g/mL}$) i spojeva s ograničenijom hidrofobnom interakcijom između dva naboja ukazala je na očuvanje antibakterijske aktivnosti uz značajno smanjenje hemolitičke toksičnosti. Konkretno, spojevi 66 i 67 pokazali su sličnu antibakterijsku učinkovitost (MIK = 1–4 $\mu\text{g/mL}$), ali znatno manju toksičnost hemolize eritrocita (HC_{50} = 805–1242 $\mu\text{g/mL}$).⁸¹

Ova istraživanja sugeriraju da će budući razvoj QACs zahtijevati napredniji pristup dizajnu molekula, u kojem će se hidrofobnost optimizirati ne samo u dvodimenzionalnoj, već i u trodimenzionalnoj konfiguraciji, čime bi se postigla selektivnija antibakterijska aktivnost uz smanjenu toksičnost prema ljudskim stanicama.

Rezultati istraživanja aromatskih polikvaternih QACs potvrđuju njihov značajan potencijal kao antimikrobnih sredstava nove generacije, osobito u borbi protiv multirezistentnih bakterijskih sojeva i biofilmova. Triskationski i tetrakationski spojevi pokazali su izrazitu učinkovitost pri vrlo niskim koncentracijama (MIK < 1 μM), uz istovremeno zadržavanje niske razine toksičnosti kada su optimizirani parametri poput duljine i rasporeda alkilnih lanaca. Istaknuta

je važnost trostruke ravnoteže između pozitivnog naboja, hidrofobnosti i trodimenzionalne organizacije molekule, što je ključno za selektivno djelovanje na bakterijske membrane bez oštećenja ljudskih stanica. Ovi podaci jasno upućuju da je racionalni dizajn aromatskih polikvaternih QACs obećavajući pravac u razvoju novih, učinkovitih i sigurnijih antimikrobnih agensa.



Slika 18. Kemijski prikaz struktura poliQACs s aromatskim supstituentima (63-65).¹

Elektrostatski naboj QACs jedan je od ključnih čimbenika koji određuju njihovu antibakterijsku aktivnost.^{43,82} Različiti strukturni kosturi QACs, uključujući mono-, bis- i polikvaterne derivate, pokazuju specifične prednosti u pogledu antimikrobne učinkovitosti, ovisno o njihovoj strukturi i broju kationskih centara. Biskvaterni spojevi pokazali su bolju antibakterijsku aktivnost u odnosu na njihove monokvaterne analoge. Primjerice, spoj 31 iskazao je snažnije djelovanje protiv *S. aureus* u usporedbi sa spojem 3, dok je spoj 40 bio potentniji od spoja 12 protiv širokog spektra bakterijskih patogena, uključujući *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*.^{42,49}

Zanimljivo je da su Forman i sur. izvijestili o nižoj vjerojatnosti razvoja bakterijske rezistencije na polikationske spojeve, poput spoja 62.^{24,39} U skladu s tim, kod mono- i biskvaternih spojeva zabilježeno je značajno povećanje MIK vrijednosti (do 60 puta) u bakterijskim sojevima koji eksprimiraju *qacA/B* gene, odgovorne za sintezu transmembranskih efluks pumpi koje smanjuju intracelularnu koncentraciju QACs. Slični rezultati potvrđeni su i u istraživanju Jenningsa i sur.⁴⁴

Međutim, zaključci o učinkovitosti kationskih QACs trebaju se razmatrati u kontekstu specifične molekularne okosnice i prisutnih modificirajućih skupina. Primjerice, određeni mono- i biskvaterni spojevi, poput spojeva 3, 4, 35 i 36, iskazali su sposobnost inhibicije rasta bakterijskih sojeva otpornih na antimikrobne lijekove. Ovi rezultati naglašavaju važnost detaljnog odnosa strukture i aktivnosti pri optimizaciji QACs za smanjenje razvoja bakterijske rezistencije.⁴⁴

Antibakterijska aktivnost QACs u odnosu na njihovu hemolitičku aktivnost može se precizno modulirati optimizacijom ravnoteže amfifilnosti, hidrofobnosti i broja neto pozitivnih naboja unutar molekule.^{82,83} Među ključnim parametrima, karakteristike hidrofobnog lanca predstavljaju jedan od najvažnijih čimbenika koji utječu na antibakterijsku učinkovitost i selektivnost QACs, pod uvjetom da je kvaterni centar strukturno fiksiran i definiran određenim skeletnim sustavom i raspodjelom naboja.

Antibakterijsko djelovanje QACs u početnim fazama raste s povećanjem hidrofobnosti molekule. Međutim, prekomjerna hidrofobnost može rezultirati smanjenom aktivnošću zbog mogućih steričkih ili membranskih interakcija, uz istovremeni porast hemolitičke toksičnosti. Eksperimentalni podaci jasno pokazuju da se antibakterijska aktivnost spoja 65 značajno poboljšava s produljenjem alkilnog lanca ($n=5-9$), no produljenje na 11 ugljikovih atoma rezultira smanjenjem antibakterijske učinkovitosti i povećanjem hemolitičkog učinka prema eritrocitima.⁸²

Daljnja analiza dostupnih podataka ukazuje da je optimalan broj hidrofobnih ugljikovih atoma unutar raspona od 6 do 16, čime se postiže poboljšana antibakterijska aktivnost, kao što je potvrđeno kod spojeva 13, 15, 47 i 55. Konkretno, spoj 65, koji sadrži osam, odnosno deset ugljikovih atoma u alkilnom lancu, pokazao je 64 puta veću aktivnost protiv *S. aureus* u odnosu na isti spoj s kraćim alkilnim lancem (šest ugljikovih atoma).

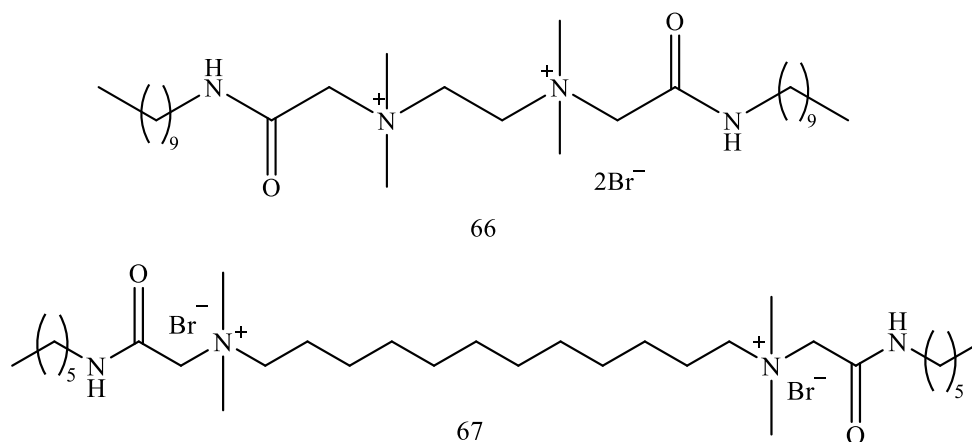
Osim toga, Hoque i suradnici primijetili su da se antibakterijska i hemolitička aktivnost QACs može dodatno prilagoditi preciznim prostornim rasporedom hidrofobnih segmenata, pri čemu

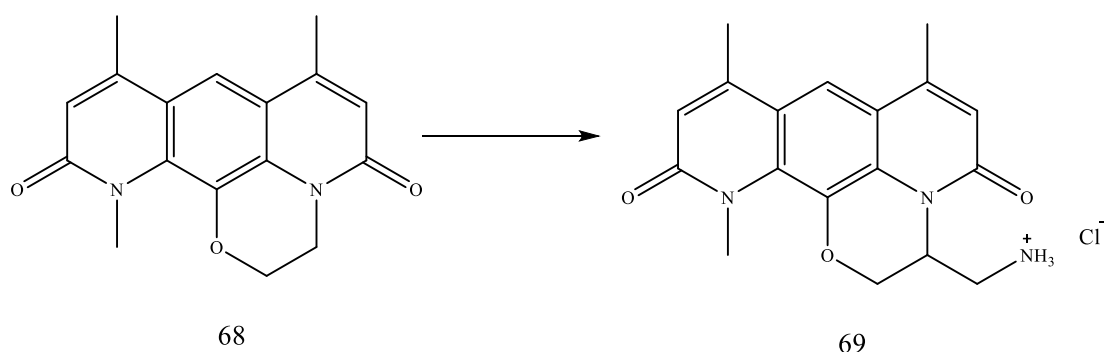
se održava konstantan broj pozitivnih naboja. Usporedba molekula s izraženijom hidrofobnošću koja se proteže od pozitivnih centara (MIK=1–4 µg/mL, IC₅₀=60–65 µg/mL) s onima kod kojih je hidrofobnost ograničena između dva naboja ukazuje na očuvanje antibakterijske aktivnosti, uz značajno smanjenje hemolitičke toksičnosti. Konkretno, spojevi 66 i 67 pokazali su sličnu antibakterijsku učinkovitost (MIK=1–4 µg/mL), ali znatno manju toksičnost hemolize eritrocita (IC₅₀=805–1242 µg/mL), slika 19.⁸¹

Ovi rezultati ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjem i optimizacijom QACs, pri čemu će buduće strategije dizajna prijeći s dvodimenzionalne na trodimenzionalnu perspektivu, omogućujući preciznije usmjeravanje hidrofobnih segmenata i poboljšanje selektivnosti između bakterijskih i humanih stanica.

Strukturne značajke okosnice predstavljaju jedan od ključnih čimbenika u regulaciji antibakterijske aktivnosti QACs. Jedan od najvećih izazova u razvoju novih antibakterijskih lijekova nije isključivo njihova specifičnost prema ciljanim biomolekulama, već prvenstveno ograničena sposobnost malih molekula da prodru kroz bakterijske membrane i akumuliraju se unutar stanica, što u konačnici određuje njihovu terapijsku učinkovitost.^{84,85}

Richter i sur. izvijestili su da se male molekule vjerojatnije akumuliraju unutar *E. coli* i pokazuju antibakterijsko djelovanje ako zadovoljavaju određene fizikalno-kemijske parametre, uključujući prisutnost ionizirajuće dušične skupine, te visoku strukturnu rigidnost – pravila poznata kao *eNTRY* pravila. Primjena ovih smjernica omogućila je modifikaciju deoksinibomicina 68, koji primarno pokazuje aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija, u derivat 69, sposoban za djelovanje protiv raznih višestruko rezistentnih bakterijskih patogena, slika 19.^{86,87}





Slika 19. Strukture potentnih antibakterijskih sredstava (66-69).

U kontekstu najnovijih istraživanja, skeletna struktura antibakterijskih QACs sve se više oslanja na rigidne heterocikličke jezgre.

Ova tendencija proizlazi iz potrebe za optimizacijom interakcija između QACs i bakterijskih membrana, kao i povećanja intracelularne akumulacije. Smatra se da određeni biološki aktivni alkaloidi, uključujući kinolinske, karbolinske, indolne, azolske i purinske strukture, predstavljaju perspektivne temeljne strukturne okosnice za dizajn novih antibakterijskih spojeva.⁸⁸

Odnos između QACs i antimikrobne rezistencije

Kvaterni amonijevi spojevi danas su široko rasprostranjeni u različitim primjenama, uključujući formulacije dezinficijensa za kućanstvo, poljoprivredu, kozmetičku industriju i industrijske procese.⁸⁹ Procjenjuje se da se približno 75% godišnje proizvedenih QACs ispušta u postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, dok se preostali dio izravno unosi u okoliš, potencijalno utječući na ekološku ravnotežu mikrobioloških zajednica.⁹⁰⁻⁹³

Masovna upotreba QACs može rezultirati selekcijskim pritiskom koji favorizira mikroorganizme višestruko rezistentne na različite antimikrobne agense putem mehanizama korezistencije (slika 20). U usporedbi s antibioticima, QACs se odlikuju značajno drugačijim mehanizmom djelovanja. Dok antibiotici ciljano interferiraju s određenim biomolekularnim

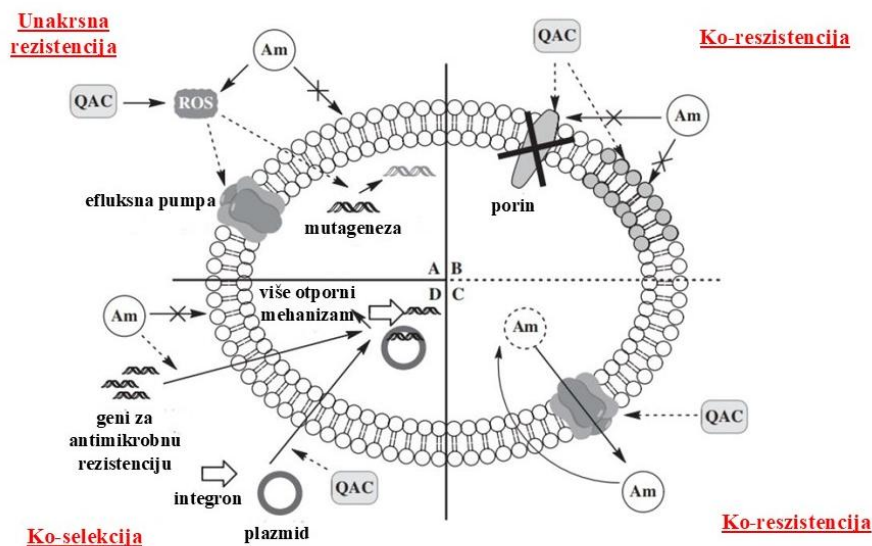
strukturama unutar bakterijske stanice, QACs djeluju neselektivno na membranske strukture, narušavajući njihovu funkcionalnost i integritet. Unatoč toj razlici, obje klase antimikrobnih spojeva mogu inducirati povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što rezultira oksidativnim stresom i potencijalnim genetskim mutacijama.⁹⁴

Ovi mutageni procesi mogu potaknuti razvoj bakterijske rezistencije na QACs, kao i istovremeno dovesti do otpornosti na antibiotike putem različitih molekularnih mehanizama. Jedan od ključnih mehanizama višestruke otpornosti uključuje mutacije u genima koji kodiraju efluks pumpe (*multidrug efflux pumps*), čime se povećava njihova ekspresija i učinkovitost u eliminaciji različitih ksenobiotika, uključujući antibiotike.⁹⁵ Alternativno, oksidativno inducirane mutacije mogu promijeniti strukturu specifičnih ciljnih mjesta antibiotika, što dodatno otežava njihovu antimikrobnu aktivnost. Eksperimentalni podaci pokazuju da mutacije nastale kao posljedica oksidativnog stresa mogu dovesti do rezistencije na klinički relevantne antibiotike kod bakterijskih sojeva koji su prethodno razvili toleranciju na QACs.⁹⁶

Drugi važan fiziološki odgovor mikroorganizama na subinhibicijske koncentracije QACs uključuje regulaciju ekspresije membranskih proteina primjerice porina, koji sudjeluju u pasivnoj difuziji različitih tvari kroz vanjsku membranu. Bakterije izložene QACs mogu smanjiti broj porinskih proteina na svojoj površini, što dovodi do smanjenja propusnosti membrane. Ova adaptacija ne samo da ograničava interakciju s QACs, već i značajno umanjuje osjetljivost bakterija na druge antimikrobne agense, uključujući klasične antibiotike. Posljedično, antibiotici gube svoju učinkovitost, jer ne mogu prodrijeti kroz bakterijsku membranu i dosegnuti intracelularne ciljeve, čime se dodatno otežava kliničko liječenje bakterijskih infekcija.⁹⁶

Kvaterni amonijevi spojevi (QACs) mogu značajno doprinijeti selekciji rezistentnih bakterijskih vrsta putem mehanizma poznatog kao ko-selekcija (slika 20). Ovaj proces podrazumijeva istovremeni razvoj otpornosti na QACs i druge antimikrobne agense uslijed horizontalnog prijenosa gena, pri čemu ključnu ulogu imaju plazmidi i integroni. Integroni predstavljaju pokretne genetske elemente koji omogućuju bakterijama akviziciju i ekspresiju gena povezanih s višestrukom rezistencijom, uključujući otpornost na antibiotike. Ovi elementi posjeduju specifične sekvence za rekombinaciju koje olakšavaju integraciju kasetnih gena, često kodirajući efluks pumpe, modifikacijske enzime i druge mehanizme obrane protiv antimikrobnih spojeva. Povećana prisutnost QACs u okolišu može selektivno favorizirati

bakterijske populacije koje nose takve genetske elemente, čime se pospješuje širenje otpornosti unutar mikrobnih zajednica.^{97,98}



Slika 20. Mehanizmi rezistencije inducirani kvaternim amonijevim spojevima (QACs) obuhvaćaju unakrsnu rezistenciju (otpornost na spojeve sa sličnim mehanizmom djelovanja), korezistenciju (istodobnu otpornost na spojeve različitih mehanizama djelovanja) te koselekciju (stjecanje rezistencije prijenosom genetskog materijala). Kratice: *Am* označava antibiotik, *QAC* kvaternu amonijevu sol, a *ROS* reaktivne kisikove vrste.⁹⁹

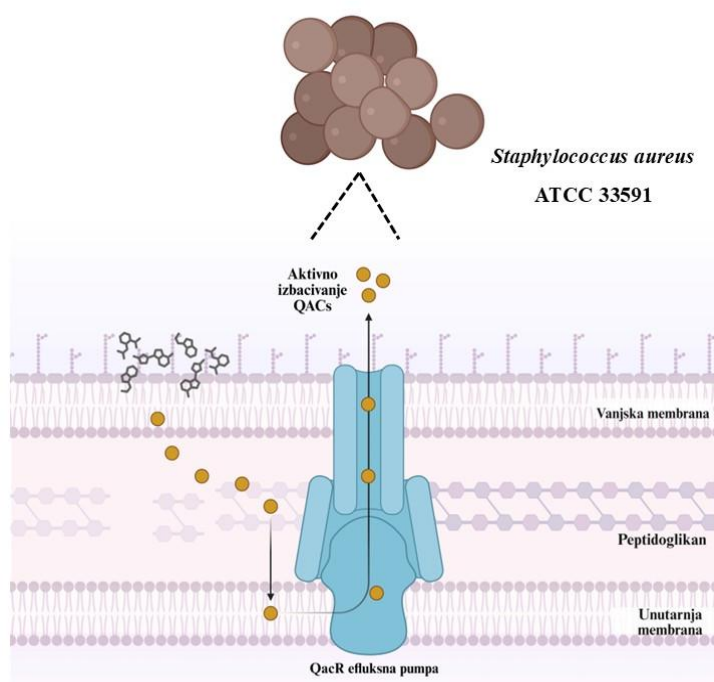
Istraživanja su pokazala da se geni otpornosti na QACs i antibiotike često nalaze u visokoj koncentraciji u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, gdje su mikroorganizmi kontinuirano izloženi subinhibicijskim koncentracijama ovih spojeva. Ovakav selektivni pritisak olakšava horizontalni prijenos gena među bakterijskim vrstama, uključujući patogene sojeve, čime se značajno povećava učestalost i rasprostranjenost višestruke rezistencije.

Ovi nalazi naglašavaju potrebu za detaljnijim istraživanjima ekoloških i kliničkih posljedica široke primjene QACs, kao i za razvojem strategija koje bi smanjile rizik od akumulacije i prijenosa gena rezistencije u bakterijskim populacijama.⁹³

U posljednjim godinama visoka rezistencija na postojeće kvaterne amonijeve soli postala je značajan javnozdravstveni problem. Do danas su identificirani različiti mehanizmi rezistencije, pri čemu je jedan od glavnih mehanizama rezistencija posredovana efluks pumpama. Efluks pumpe

predstavljaju skupinu bakterijskih transportnih proteina koji doprinose razvoju rezistencije na kvaterne amonijeve soli, djelujući kao membranski proteini koji posreduju u transportu antimikrobnih sredstava iz unutrašnjosti stanice u vanjsko okruženje.¹⁰⁰

Od otkrića prve efluks pumpe otporne na lijekove 1990-ih godina, razvoj molekularne mikrobiologije omogućio je karakterizaciju brojnih efluks pumpi u Gram-pozitivnim bakterijama, uključujući meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA).¹⁰¹ Za razliku od većine drugih determinanti rezistencije, efluks pumpe često su intrinzične. Geni koji kodiraju ove transportere prisutni su u osjetljivim i rezistentnim bakterijama te su često dio operona čija je ekspresija strogo regulirana transkripcijskim regulatornim proteinima. Najrašireniji gen odgovoran za rezistenciju na QACs u Gram-pozitivnim bakterijama je qacA/B genski sustav, koji kodira efluks proteine QacA i QacB.¹⁰² Oba proteina pripadaju obitelji glavnih olakšanih transportera (Major Facilitator Superfamily, MFS).¹⁰³ Ekspresija efluksog sustava za QACs kontrolirana je negativnim transkripcijskim regulatornim proteinom QacR, koji regulira ekspresiju efluks pumpi u višestruko rezistentnim bakterijama, slika 21.¹⁰⁴



Slika 21. Mehanizam otpornosti bakterije meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) putem QacR-regulirane efluks pumpe. Slika je kreirana pomoću programa BioRender (www.biorender.com, pristupljeno 26. lipnja 2025.).

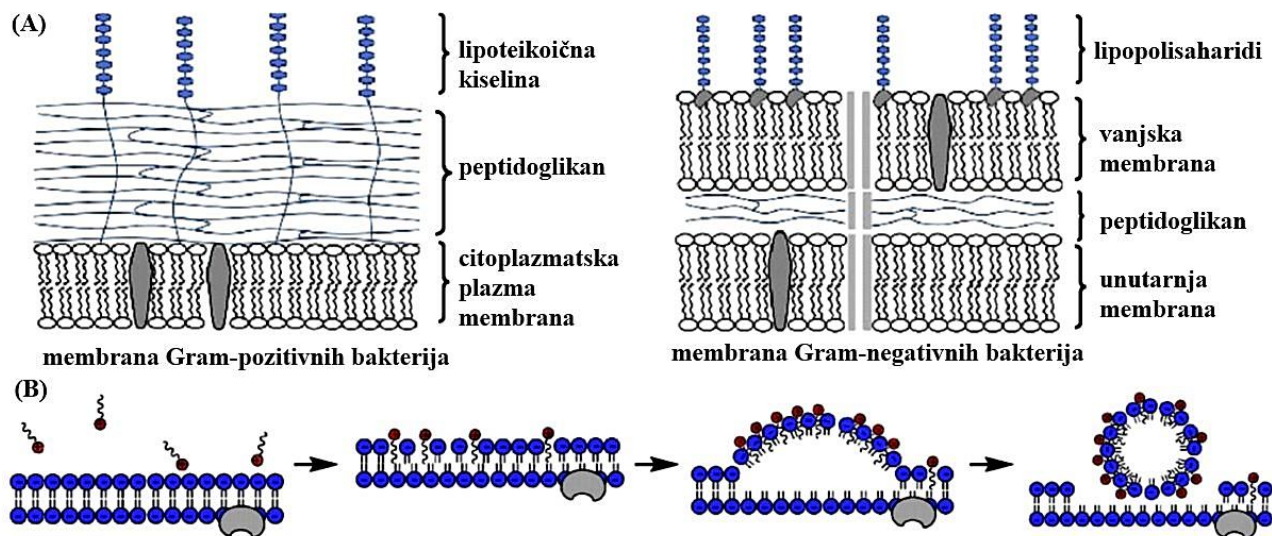
Antibakterijski mehanizam djelovanja

Bakterijska membrana, kao esencijalna komponenta u svim fazama životnog ciklusa bakterije, predstavlja ključnu strukturu odgovornu za metabolizam i homeostatske procese, pri čemu sadrži gotovo jednu trećinu ukupnih proteina uključenih u bakterijski metabolizam. Iz tog razloga, bakterijska membrana je jedan od primarnih ciljeva kvaternih amonijevih spojeva (QACs) u njihovom antibakterijskom djelovanju, s obzirom na sposobnost ovih spojeva da oponašaju mehanizme djelovanja antimikrobnih peptida.^{32,105}

Membranski aktivni agensi, uključujući QACs ne samo da induciraju oštećenja bakterijske membrane već mogu i smanjiti rizik od razvoja antibiotske rezistencije te djelovati kao kemosenzibilizatori putem permeabilizacije membrane. Strukturna i kemijska svojstva bakterijskih membrana igraju ključnu ulogu u interakcijama s ovim spojevima. Stanična membrana Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija ima ključne strukturne razlike, prikazano na slici 22 (A). Gram-pozitivne bakterije imaju debeli sloj peptidoglikana u staničnoj stijenci, u kojem su vezane teikoične i lipoteikoične kiseline s negativno nabijenim anionskim skupinama. Ovaj sloj pruža zaštitu i stabilnost stanici. S druge strane, Gram-negativne bakterije imaju tanji peptidoglikanski sloj, ali dodatnu vanjsku membranu koja sadrži fosfolipide i lipopolisaharide (LPS).

Vanjska membrana Gram-negativnih bakterija djeluje kao dodatna barijera koja štiti stanicu od vanjskih utjecaja, uključujući antibiotike, čime se značajno povećava njihova otpornost na mnoge terapije. Nasuprot tome, membrane stanica sisavaca dominantno sadrže zwitterionske fosfolipide, poput sfingomijelina i fosfatidilkolina, koji imaju neutralan ukupni naboj. Zbog toga je elektrostatika interakcija s kationskim kvaternim amonijevim spojevima znatno slabija, što doprinosi smanjenoj citotoksičnosti QACs prema eukariotskim stanicama i omogućuje selektivnije djelovanje prema bakterijskim membranama.^{105–107}

Mehanizam djelovanja QACs prikazan je na slici 22 (B). Započinje elektrostatskom interakcijom između kationskih skupina ovih spojeva i anionske površine bakterijske membrane. Nakon inicijalnog vezanja na površinu, QACs prolaze kroz staničnu stijenu, pri čemu hidrofobni karakter njihove strukture dodatno olakšava inkorporaciju u membranu. Nepolarni alkilni lanci QACs interkaliraju u lipidni dvosloj, inducirajući stvaranje pora, kompromitaciju membrane i povećanu permeabilnost, što posljedično dovodi do lize stanice i bakterijske smrti.^{74,77,108}



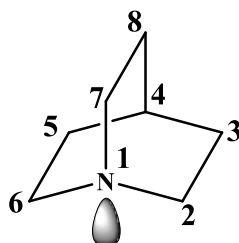
Slika 22. (A) Prikaz strukturalnih razlika između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te (B) mehanizam djelovanja QACs.^{105,108}

Eksperimentalne studije pokazale su da brojni QACs, posjeduju sposobnost značajnog narušavanja bakterijske membrane. Oštećenja membrane mogu se detektirati nizom sofisticiranih biofizičkih i biokemijskih tehnika. Morfološke promjene stanične membrane moguće je vizualizirati SEM i TEM mikroskopijom.¹⁰⁹ Nadalje, fluorescentna mikroskopija omogućuje istraživanje specifičnih aspekata membranske disfunkcije korištenjem različitih fluorofora: depolarizacija membrane može se analizirati pomoću boje DISC3(5), permeabilizacija lipidnog dvosloja pomoću NPN, PI i SYTOX Green, dok se cjelovitost membrane može ispitati DAPI/PI bojanjem.¹¹⁰ Uz to, kvantifikacija curenja intracelularnih proteina i nukleinskih kiselina predstavlja dodatni metodološki pristup u procjeni stupnja oštećenja membrane.¹¹¹

Strukturna, fizikalno-kemijska i farmakološka svojstva

kinuklidina i njegovih derivata

Kinuklidin (1-azabicyklo[2.2.2]oktan, slika 23) je bijela, kristalna i hlapljiva krutina s C_{3v} simetrijom, što znači da ima glavnu trostruku os rotacije i tri vertikalne ravnine simetrije. Simetrija kinuklidina potvrđena je kvantnoteorijskim proračunima i eksperimentalno metodama elektronske i rendgenske difrakcije, što omogućuje preciznu karakterizaciju molekule.¹¹² Kinuklidin je lako topiv u vodi, kao i u različitim vrstama organskih otapala.

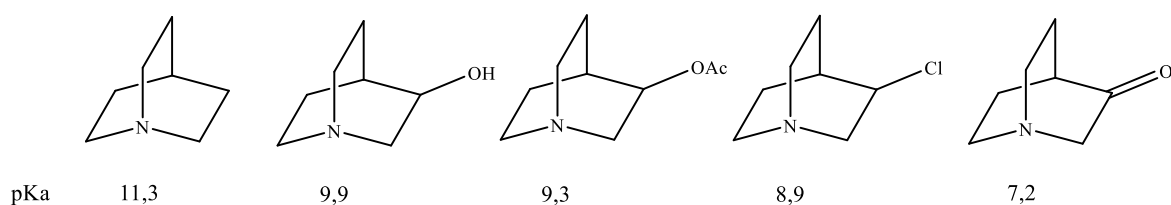


Slika 23. Strukturni prikaz molekule kinuklidina s naznakom numeriranja atoma u bicikličkom sustavu.

Heterociklički prirodni alkaloid, kinuklidin, je vrlo kruta struktura koja se sastoji od zasićenog bicikličkog sustava s dušikovim atomom u premoštenju. Značajan je zbog vrlo niske energije potrebne za protoniranje dušika, što ga čini izuzetno jakom bazom u organskoj sintezi. Navedene značajke strukture kinuklidina objašnjavaju neka njegova fizikalna i kemijska svojstva te omogućuju funkcionalizaciju na različitim položajima bicikličkog sustava, osobito na položaju C-3. Na primjer, nesupstituirani kinuklidin je hlapljivi kristalni spoj s visokim talištem (158 °C). Narušavanjem simetrije molekule kinuklidina (uvođenje alkilnih supstituenata u kinuklidinijev prsten) smanjuje se talište (4-metilkinuklidin talište 49-50 °C). Kruta biciklička struktura kinuklidina značajno doprinosi njegovoj kemijskoj i termodinamičkoj stabilnosti. Struktura molekule kinuklidina se ne mijenja zagrijavanjem s različitim koncentriranim mineralnim kiselinama (HCl, HI, H₂SO₄, HNO₃) ili tretiranjem s jakim oksidansima kao npr. KMnO₄.¹¹³

Dušikovi slobodni parovi elektrona su sp^3 -hibridizirani i ne podliježu steričkoj natrpanosti. Bazičnost kinuklidina, koja ovisi o gustoći elektrona na atomu dušika, vrlo je slična onoj koja je opažena u alifatskima aminima i *N*-alkilpiperidinu. Kinuklidin, kao i drugi tercijarni amini, lako tvori soli s mineralnim i organskim kiselinama. Također, s alkil ili aril halogenidima kinuklidin tvori kvaterne amonijeve spojeve brže nego s tercijarnim alifatskim aminima. Ovi zaključci se mogu objasniti gotovo potpunim nedostatkom steričkih smetnji na dušikovom usamljenom elektronskom paru bicikličke strukture.¹¹³

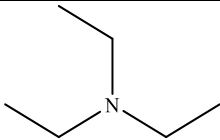
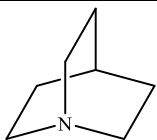
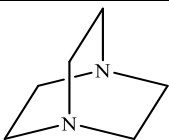
U supstituiranom kinuklidinu bazičnost se smanjuje zbog utjecaja induktivnog efekta supstituirane skupine, slika 24. U nizu 3-supstituiranih kinuklidina, reaktivnost je u korelaciji s njihovim pK_a vrijednostima pri čemu nesupstituirani kinuklidin pokazuje najveću pK_a vrijednost te je ujedno i najreaktivniji s alkilirajućim reagensima.



Slika 24. Bazičnost kinuklidina i njegovih 3-supstituiranih derivata s pripadajućim pK_a vrijednostima.¹¹³

Kako bismo to ilustrirali, stopa brzine reakcija kinuklidina, trietilamina, Et_3N i DABCO je uspoređena s metil jodidom (**Tablica 1**).

Tablica 1. Prikaz usporedbe brzine reakcije kinuklidina, trietilamina i DABCO-a s metil-jodidom.

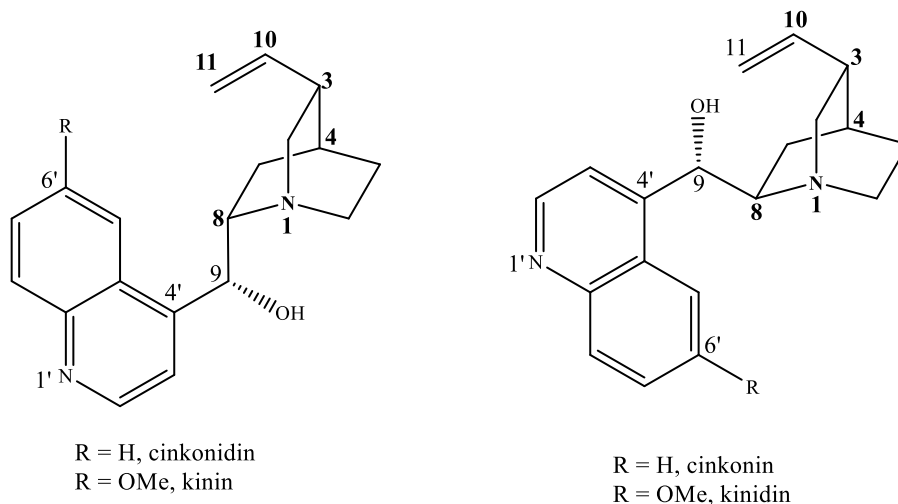
			
	Trietilamin	Kinuklidin	DABCO
Relativna brzina reakcije ^a	1	63	40
pK_a	10,7	11,0	8,8

^a Relativna brzina reakcije s metil-jodidom pri 25 °C izražena je kao bezdimenzionalni omjer u odnosu na brzinu trietilamina.

Budući da je atom dušika kinuklidina nesputan zbog nepostojanja utjecaja alkilnih skupina, on je 63 puta reaktivniji prema metil jodidu od trietilamina. Smanjena sterička smetnja alkilnih supstituenata omogućuje da usamljeni par elektrona na dušiku bude pristupačniji za napad na elektrofil. Sterička priroda tercijarnog amina manje je važna u određivanju pK_a , otuda sličnost u pK_a između kinuklidina i trietilamina. Važnija determinata u određivanju pK_a je gustoća elektrona prisutna na dušiku. Drugi dušik u DABCU ima induktivni učinak, oduzima elektronsku gustoću od drugog, smanjujući bazičnost DABCA.

Alkaloidi cinchone nalaze se u drveću *Cinchona* i *Remijia*, a kora ovih stabala koristi se kao moćan lijek protiv malarije od 16. stoljeća. Početkom 19. stoljeća izolirani su aktivni spojevi ovih stabala. Tada je izolirano više od trideset spojeva, od kojih su četiri bila glavna: kinin, kinidin, cinkonidin i cinkonin, slika 25.

S obzirom na dugu tradiciju u narodnoj medicini, kinuklidin je atraktivna meta za daljnja istraživanja u polju medicinske kemije. Danas, na bazi kinuklidina, neki od najvažnijih lijekova koje je odobrila FDA (engl. *Food and Drug Administration*) imaju različitu primjenu u liječenju. Međutim, antimikrobni potencijal kinuklidina tek nedavno počinje biti predmetom znanstvenih istraživanja.



Slika 25. Strukturni prikaz diastereoizomera članova obitelji Cinchona.¹¹⁴

Osim njihove farmakološke važnosti, alkaloidi Cinkona našli su široku primjenu kao ligandi u čitavom nizu asimetričnih transformacija uključujući *cis*-dihidroksilaciju alkena, hidrogenaciju ketona s faznim prijenosom i enantioselektivne reakcije halogeniranja.¹¹⁴

U literaturi je zabilježeno da znatan broj sintetskih spojeva s izraženim farmakološkim djelovanjem, uključujući antiaritmijsko i antihistaminsko, u svojoj strukturi sadržava kinuklidinijev fragment.¹¹⁵ Posebnu pozornost privukli su 3-supstituirani derivati kinuklidina zbog svoje strukturne raznolikosti i pripadajućih farmakodinamičkih svojstava. Esterski derivati kinuklidin-3-ola predmet su intenzivnih istraživanja te su prepoznati kao bioaktivni spojevi od značaja za medicinsku primjenu, pri čemu je određen broj predstavnika, poput aceklidina, razvijen i kao komercijalni lijek.¹¹⁵ Prema recentnim izvješćima, kvarternizirani 3-supstituirani kinuklidinijski derivati pokazuju antibakterijsko djelovanje prema klinički relevantnim bakterijskim sojevima, uz minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) u području mikromolarnih vrijednosti.^{14,15,116}

Unutar skupine derivata 3-amidokinuklidina ističe se njihovo djelovanje kao klasičnih antagonista 5-hidroksitriptaminskih 3 (5-HT₃) receptora. Ta se farmakološka aktivnost objašnjava prisutnošću univerzalno prihvaćenog farmakofora, koji uključuje bazni atom dušika, karbonilnu funkcionalnu skupinu i aromatski prsten. Među predstavnicima koji sadržavaju 3-amidokinuklidinijev fragment posebno se izdvajaju zakoprid i RG 12915.¹¹⁷ Dodatno, spojevi ove strukturne vrste razmatrani su i u kontekstu razvoja potencijalnih antidota za organofosforne otrove, uključujući i spojeve koji pripadaju skupini kemijskih ratnih agenasa.^{118–122}

Zbog prisutnosti asimetričnog ugljikovog atoma na 3. položaju, sinteza 3-supstituiranih kinuklidinijskih derivata koja polazi od kinuklidin-3-ola ili 3-aminokinuklidina u pravilu rezultira dobivanjem racemata. U farmaceutskoj praksi racemične smjese rijetko se smatraju prihvatljivima, budući da pojedini enantiomeri istog bioaktivnog spoja mogu pokazivati divergentne biološke učinke – od smanjene terapijske učinkovitosti do izražene toksičnosti. Sukladno tome, značajan dio istraživačkih napora usmjeren je na razvoj metoda razdvajanja racemičnih derivata kinuklidin-3-ola, pri čemu su primjenjivane i kemijske i biokatalitičke strategije.^{123–126} Kao primjer biokatalitičkog pristupa može se istaknuti uporaba butirilkolinesteraze (BChE, EC 3.1.1.8) izolirane iz konjskog seruma, koja je pokazala selektivnost u hidrolizi esterskih derivata kinuklidin-3-ola.^{123,127–129} Međutim, u slučaju 3-amidokinuklidina dostupni podaci o razdvajanju enantiomera, bilo kemijskim bilo biokatalitičkim metodama, ostaju ograničeni i u literaturi su tek rijetko opisani.^{130–132}

3. Eksperimentalni dio

3.1. Sinteza QACs

Sve korištene kemikalije za organsku sintezu bile su analitičke čistoće. Za sintezu mono- i bisQACs derivata 3-supstituiranih kinuklidina, ključno je osigurati visoku čistoću ne samo potrebnih polaznih spojeva, već i organskih otapala. Stoga su korištena komercijalno dostupna otapala (dietil-eter, aceton, kloroform, acetonitril i diklormetan) dodatno pročišćavana i predestilirana prema uobičajenoj proceduri opisanoj u literaturi.¹³³

Korišteni spojevi, uključujući ($\pm$)-3-aminokinuklidin dihidroklorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, 98%, $M_r=199,12$), kinuklidin-3-on hidroklorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, 97%, $M_r=161,63$), kalijev hidroksid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska, p.a., $M_r=56,11$), 1-bromdodekan (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, SAD, 98%, $M_r=249,24$, $\rho=1,040$ g/mL), 1-bromtetradekan (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, SAD, 98%, $M_r=277,30$, $\rho=1,018$ g/mL), 1-bromheksadekan (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, SAD, 98%, $M_r=305,35$, $\rho=1,000$ g/mL), anhidrid benzojeve kiseline (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, SAD, 98%, $M_r=226,23$), 2-bromacetil bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, $\geq 98\%$, $M_r=201,84$), dodecilamin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD, 98%, $M_r=185,35$), tetradecilamin (Acros Organics, Geel, Belgija, 98%, $M_r=213,40$), heksadecilamin (Merck, Darmstadt, Njemačka, 98%, $M_r=241,46$), natrijev cijanoborhidrid (NaBH_3CN , Merck, za sintezu, $M_r=62,84$), 1,3-dibrompropan (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka, 98%, $M_r=201,89$), 1,4-dibrombutan (Aldrich Chemistry, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, 99%, $M_r=215,91$) i 1,6-dibromheksan (Alfa Aesar, Haverhill, MA, SAD, 97%, $M_r=243,97$), bili su komercijalno dostupni i nisu podvrgnuti dodatnom pročišćavanju.

Praćenje tijeka reakcija, identifikacija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva provedeni su metodama tankoslojne kromatografije (TLC), te nuklearne magnetske rezonancije (^1H i ^{13}C NMR).

Tankoslojna kromatografija izvedena je na aluminijevim oksidnim pločicama DC-Alufolie Aluminiumoxid 60 F254 (Merck, Readington Township, NJ, SAD). Supstancije su vizualizirane reverzibilnom adicijom joda ili pomoću UV-lampe (Analytik Jena). Otapala su uparena na rotacijskom uparivaču LabTech, EV400 VAC proizvođača Ansar Analitika.

NMR spektri snimljeni su na instrumentima Bruker AV500 (600 MHz) i Bruker AV600 (150 MHz) u deuteriranim otapalima DMSO- d_6 i MeOH- d_4 pri sobnoj temperaturi. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u dijelovima na milijun (ppm), a kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS). Konstante sprege (J) prikazane su u hercima (Hz). Signali su označeni prema standardnoj notaciji: *s* (singlet), *d* (dublet), *t* (triplet), *dd* (dublet dubleta), *m* (multiplet).

Tališta su određena pomoću uređaja Büchi Melting Point M-560, uz korištenje otvorenih kapilara.

Za provedbu bioloških ispitivanja korištene su sljedeće kemikalije:

- Hranidbeni mediji: Mueller-Hinton Broth, Yeast Extract, Agar Bios Special, Peptone-Tryptone Water (Biolife, Italija), natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska), Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, (Capricorn Scientific, Njemačka).
- Puferska otopina: puferirana otopina fosfatnih soli (pH=7,0) PBS.
- Otapala: dimetil sulfoksid, DMSO ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD, $M_r=78,13$), ultradestilirana miliQ H₂O, etanol, C₂H₅OH, (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska, 70%, $M_r=46,07$)
- Reagensi: jodonitrotetrazolijev klorid, INT (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD, 95%, $M_r=505,70$).

Priprema medija za uzgoj bakterija:

1. Priprema tekućeg Mueller-Hinton medija (MH).

Za pripremu 1 litre Mueller-Hinton medija, u 1 L ultradestilirane miliQ vode otopi se 22,0 g Mueller-Hinton Broth (Biolife). Miješanjem se osigurava potpuno otapanje. Otopinu se zatim sterilizira autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, medij se ohladi na sobnu temperaturu te je spreman za korištenje.

2. Priprema čvrstog Mueller-Hinton medija (MH).

Za pripremu 1 litre čvrstog Mueller-Hinton medija, u 1 L ultradestilirane vode otopi se 22,0 g Mueller-Hinton Broth i 15,0 g agara (Biolife). Smjesa se miješa dok se potpuno ne otopi. Otopinu se zatim sterilizira autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, medij se ohladi na 50 °C, a zatim izlije u Petrijeve zdjelice. Ostaviti da se stvrdne na sobnoj temperaturi prije upotrebe.

3. Priprema tekućeg Nutrient Agar medija (NA).

Za pripremu 1 litre Nutrient Agar medija, u 1 L ultradestilirane miliQ vode otopi se 5,0 g Peptone-Tryptone ekstrakta, 3,0 g Yeast ekstrakta (Biolife) te 5,0 g natrijevog klorida (Kemika). Miješanjem se osigurava potpuno otapanje. Otopinu se zatim sterilizira autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, medij se ohladi na sobnu temperaturu te je spreman za korištenje.

4. Priprema čvrstog Nutrient Agar medija (NA).

Za pripremu 1 litre čvrstog Nutrient Agar medija, u 1 L ultradestilirane vode otopi se 5,0 g Peptone-Tryptone ekstrakta, 3,0 g Yeast ekstrakta, 15,0 agara (Biolife) te 5,0 g natrijevog klorida (Kemika). Smjesa se miješa dok se potpuno ne otopi. Otopinu se zatim sterilizira autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, medij se ohladi na 50 °C, a zatim izlije u Petrijeve zdjelice. Ostaviti da se stvrdne na sobnoj temperaturi prije upotrebe.

Priprema puferske otopine:

Za pripremu 1 L 10x PBS pufera, u 800 mL ultradestilirane vode otopi se sljedeće: 80,0 g natrijevog klorida (Chem-Lab NV, Zedelgem, Belgija, p.a., $M_r=58,44$), 2,0 g kalijevog klorida (Kemika, Zagreb, Hrvatska, p.a., $M_r=74,56$), 14,4 g natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska, p.a., $M_r=137,99$) te 2,4 g kalijevog dihidrogenfostata (Kemika, Zagreb, Hrvatska, p.a., $M_r=136,09$)

Otopinu dobro promiješati dok se sve komponente potpuno ne otope. Nakon toga, dodati ultradestiliranu miliQ vodu kako bi se postigao ukupan volumen od 1 L. Otopinu pohraniti u hermetički zatvorenu posudu i sterilizirati autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta.

3.1.1. Sinteza monoQACs

Sinteza QACs ($\pm$)-3-benzamidokinuklidina i ($\pm$)-3-acetamidokinuklidina s alkilnim lancima

Reakcije kvaternizacije ($\pm$)-3-benzamidokinuklidina i ($\pm$)-3-acetamidokinuklidina provedene su u balonu pod dušikovom atmosferom (N_2), pri sobnoj temperaturi, uz stalno miješanje u suhom acetonitrilu kao otapalu. Kao kvaternizirajući reagensi korišteni su 1-bromdodekan, 1-bromtetradekan i 1-bromheksadekan (Alfa Aesar) u ekvimolarnoj količini u odnosu na početne spojeve. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) u sustavu otapala kloroform:metanol ($CHCl_3:MeOH=5:1$). Dobiveni produkti pročišćeni su suhim Et_2O , nakon čega je otapalo upareno na rotavaporu.

Sinteza prekursora ($\pm$)-3-benzamidokinuklidina i ($\pm$)-3-acetamidokinuklidina za reakciju kvaternizacije je već ranije opisana.¹³⁴

3.1.1.4. ($\pm$)-*N*-Dodecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid (**QBn-C₁₂**)

Spoj ($\pm$)-*N*-dodecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom ($\pm$)-3-benzamidokinuklidina (30 mg, 0,130 mmol) i 1-bromdodekana (0,031 mL, 0,130 mmol). Dobiveni je produkt oznake QBn-C₁₂, $M_r=479,55$, ($m=36,60$ mg, $\eta=58,59\%$), *t.t.* 49-52 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 0,85 (*t*, $J=6,98$ Hz, 3H, H12'), 1,20–1,37 (*m*, 18H, H3'–H11'), 1,62–1,73 (*m*, 2H, H2'), 1,78–1,85 (*m*, 1H, H5 trans), 1,96–2,00 (*m*, 2H, H8), 2,16–2,28 (*m*, 2H, H4, H5cis), 3,13–3,18 (*m*, 2H, H1'), 3,34–3,53 (*m*, 5H, H6, H7, H2 trans), 3,79–3,84 (*m*, 1H, H2 cis), 4,33–4,38 (*m*, 1H, H3), 7,48–7,51 (*m*, 2H, H3, H5 bz), 7,56–7,58 (*m*, 1H, H4 bz), 7,89 (*d*, $J=7,16$ Hz, 2H, H2, H6 bz), 8,63 (*d*, $J=5,67$ Hz, 1H, CONH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 13,36 (C12'), 17,81, 21,49, 21,68, 27,91, 28,10, 28,17, 28,33, 28,40, 28,41, 30,69 (C2'–C11'), 20,78 (C7), 23,65 (C4), 25,31 (C5), 44,90 (C3), 52,95, 52,41 (C6, C8), 58,00 (C1'), 62,68 (C2), 126,91 (C2, C6 bz), 127,67 (C3, C5 bz), 130,96 (C4 bz), 133,29 (C1 bz), 166,35 (C=O).

3.1.1.5. (±)-*N*-Tetradecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid (**QBn-C₁₄**)

Spoj (±)-*N*-tetradecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom (±)-3-benzamidokinuklidina (20 mg, 0,087 mmol) i 1-bromtetradekana (0,024 mL, 0,087 mmol). Dobiveni je produkt oznake QBn-C₁₄, *M_r*=507,60, (*m*=42 mg, *η*=95,28%), *t.t.* 111-113 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) *δ*/ppm: 0,85 (*t*, *J* = 6,98 Hz, 3H, H14'), 1,19–1,35 (*m*, 22H, H3'–H13'), 1,60–1,73 (*m*, 2H, H2'), 1,79–1,85 (*m*, 1H, H5 trans), 1,96–2,01 (*m*, 2H, H8), 2,16–2,26 (*m*, 2H, H4, H5 cis), 3,13–3,18 (*m*, 2H, H1'), 3,34–3,55 (*m*, 5H, H6, H7, H2 trans), 3,80–3,85 (*m*, 1H, H2 cis), 4,33–4,39 (*m*, 1H, H3), 7,47–7,52 (*m*, 2H, H3, H5 bz), 7,56–7,59 (*m*, 1H, H4 bz), 7,89 (*d*, *J* = 7,16 Hz, 2H, H2, H6 bz), 8,64 (*d*, *J* = 5,67 Hz, 1H, CONH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) *δ*/ppm: 13,36 (C14'), 17,82, 21,50, 21,69, 27,93, 28,12, 28,19, 28,32, 28,35, 28,40, 28,45, 28,46, 30,70 (C2'–C13'), 20,80 (C7), 23,68 (C4), 25,32(C5), 44,92 (C3), 52,78, 52,95 (C6, C8), 57,92 (C1'), 62,68 (C2), 126,94 (C2, C6 bz), 127,68 (C3, C5 bz), 130,96 (C4 bz), 133,27 (C1 bz), 166,33 (C=O).

3.1.1.6. (±)-*N*-Heksadecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid (**QBn-C₁₆**)

Spoj (±)-*N*-heksadecil-3-benzamidokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom (±)-3-benzamidokinuklidina (20 mg, 0,087 mmol) i 1-bromheksadekana (0,027 mL, 0,087 mmol). Dobiveni je produkt oznake QBn-C₁₆, *M_r*=535,66, (*m*=44,90 mg, *η*=96,52%), *t.t.* 120-122 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) *δ*/ppm: 0,85 (*t*, *J* = 6,98, 3H, H16'), 1,20–1,33 (*m*, 26H, H3'–H15'), 1,62–1,71 (*m*, 2H, H2'), 1,78–1,85 (*m*, 1H, H5 trans), 1,97–2,00 (*m*, 2H, H8), 2,16–2,28 (*m*, 2H, H4, H5 cis), 3,14–3,19 (*m*, 2H, H1'), 3,35–3,54 (*m*, 5H, H6, H7, H2 trans), 3,79–3,84 (*m*, 1H, H2 cis), 4,34–4,39 (*m*, 1H, H3), 7,48–7,51 (*m*, 2H, H3, H5 bz), 7,56–7,58 (*m*, 1H, H4 bz), 7,89 (*d*, *J* = 7,16 Hz, 2H, H2, H6 bz), 8,64 (*d*, *J* = 5,67, 1H, CONH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) *δ*/ppm: 13,36 (C16'), 17,83, 21,50, 21,70, 27,94, 28,12, 28,20, 28,32, 28,36, 28,42, 28,43, 28,47, 30,70, 31,65, 34,59 (C2'–C15'), 20,81 (C7), 23,68 (C4), 25,33(C5), 44,92 (C3), 52,79, 52,96 (C6, C8), 57,94 (C1'), 62,69 (C2), 126,94 (C2, C6 bz), 127,67 (C3, C5 bz), 130,96 (C4 bz), 133,28 (C1 bz), 166,33 (C=O).

3.1.1.7. (±)-*N*-Dodecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid (**QAc-C₁₂**)

Spoj (±)-*N*-dodecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom (±)-3-acetamidokinuklidina (30 mg, 0,178 mmol) i 1-bromdodekana (0,043 mL, 0,178 mmol). Dobiveni je produkt oznake QAc-C₁₂, $M_r=417,48$, ($m=54,70$ mg, $\eta=73,48\%$).

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 0,86 (*t*, $J = 6,86$ Hz, 3H, H12'), 1,20–1,37 (*m*, 18H, H3'–H11'), 1,56–1,67 (*m*, 2H, H2'), 1,80–2,15 (*m*, 4H, H5 i H8), 2,08 (*s*, 3H, CH₃C=O), 2,25–2,30 (*m*, 1H, H4), 2,95–2,98 (*m*, 2H, H1'), 3,30–3,55 (*m*, 5H, H6, H7 i H2 *cis*), 3,80–3,95 (*m*, 1H, H2 *trans*), 4,95–4,98 (*m*, 1H, H3), 8,32 (*d*, $J = 5,98$ Hz, 1H, CONH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 13,35 (C12'), 18,78, 21,49, 21,68, 27,92, 28,09, 28,19, 28,32, 28,39, 28,41, 29,32–29,56, 30,70 (C2'–C11', C5, C8), 20,85 (CH₃C=O), 23,15 (C4), 50,86 (C3), 55,05 (C6), 55,65 (C7), 61,62 (C2), 67,36 (C1'), 166,34 (C=O).

3.1.1.8. (±)-*N*-Tetradecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid (**QAc-C₁₄**)

Spoj (±)-*N*-tetradecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom (±)-3-acetamidokinuklidina (30 mg, 0,178 mmol) i 1-bromtetradekana (0,049 mL, 0,178 mmol). Dobiveni je produkt oznake QAc-C₁₄, $M_r=445,53$, ($m=75,70$ mg, $\eta=95,28\%$), *t.t.* 50-52 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 0,85 (*t*, $J = 6,87$ Hz, 3H, H14'), 1,21–1,36 (*m*, 22H, H3'–H13'), 1,56–1,66 (*m*, 2H, H2'), 1,79–2,14 (*m*, 4H, H5 i H8), 2,07 (*s*, 3H, CH₃C=O), 2,24–2,31 (*m*, 1H, H4), 2,96–2,99 (*m*, 2H, H1'), 3,30–3,55 (*m*, 5H, H6, H7 i H2 *cis*), 3,80–3,95 (*m*, 1H, H2 *trans*), 4,95–4,98 (*m*, 1H, H3), 8,32 (*d*, $J = 5,99$ Hz, 1H, CONH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 13,36 (C14'), 18,77, 21,49, 21,68, 27,91, 28,10, 28,17, 28,33, 28,40, 28,41, 29,32–29,56, 30,69 (C2'–C13', C5, C8), 20,86 (CH₃C=O), 23,17 (C4), 50,84 (C3), 55,07 (C6), 55,65 (C7), 61,62 (C2), 67,36 (C1'), 166,34 (C=O).

3.1.1.9. (±)-*N*-Heksadecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid (**QAc-C₁₆**)

Spoj (±)-*N*-heksadecil-3-acetamidokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom (±)-3-acetamidokinuklidina (30 mg, 0,178 mmol) i 1-bromheksadekana (0,054 mL, 0,178 mmol). Dobiveni je produkt oznake QAc-C₁₆, $M_r=473,58$,

($m=73$ mg, $\eta=86,44\%$), *t.t.* 59-62 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 0,85 (*t*, $J = 6,88$ Hz, 3H, H16'), 1,20–1,37 (*m*, 26H, H3'–H15'), 1,56–1,67 (*m*, 2H, H2'), 1,80 2,15 (*m*, 4H, H5 i H8), 2,08 (*s*, 3H, CH₃C=O), 2,25–2,30 (*m*, 1H, H4), 2,98–3,00 (*m*, 2H, H1'), 3,30–3,55 (*m*, 5H, H6, H7 i H2 *cis*), 3,80–3,95 (*m*, 1H, H2 *trans*), 4,95–4,98 (*m*, 1H, H3), 8,32 (*d*, $J = 5,98$ Hz, 1H, CONH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 13,36 (C16'), 18,78, 21,49, 21,68, 27,91, 28,10, 28,17, 28,33, 28,40, 28,41, 29,32–29,56, 30,69 (C2'–C15', C5, C8), 20,86 (CH₃C=O), 23,17 (C4), 50,84 (C3), 55,07 (C6), 55,65 (C7), 61,62 (C2), 67,36 (C1'), 166,34 (C=O).

Sinteza QACs ($\pm$)-3-aminokinuklidina i kinuklidin-3-ona s alkilnim lancima

Za reakciju kvaternizacije ($\pm$)-3-aminokinuklidina odnosno kinuklidin-3-ona bilo je potrebno iste dobiti deprotoniranjem komercijalnih kemikalija. U tu svrhu postupno je dodavana zasićena otopina kalijeva hidroksida do postizanja pH ~ 10 . Dobivena smjesa miješana je na magnetskoj miješalici, nakon čega je provedena višestruka ekstrakcija kloroformom (10 $\times$ 5 mL). Sakupljeni organski slojevi osušeni su na bezvodnom kalijevom karbonatu, a otapalo je uklonjeno uparavanjem pod sniženim tlakom na rotavaporu. Reagensi korišteni za reakciju kvaternizacije su 1-bromdodekan, 1-bromtetradekan i 1-bromheksadekan (Alfa Aesar) u ekvimolarnoj količini u odnosu na deprotonirane derivate kinuklidina. Reakcije kvaternizacije provedene su u balonu pod dušikovom atmosferom (N₂), pri sobnoj temperaturi, uz kontinuirano miješanje u suhom acetonu kao otapalu. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) u sustavu otapala kloroform:metanol (CHCl₃:MeOH=5:1). Nakon završetka reakcije, reakcijski filtrat uklonjen je uparavanjem pod sniženim tlakom na rotavaporu. Dobiveni produkt istaložen je dodatkom Et₂O te višestrukim uparavanjem Et₂O do zadovoljavajuće čistoće. Dobiveni produkti su bile krutine dobivene u visokim iskorištenjima.

3.1.1.10. ($\pm$)-*N*-Dodecil-3-aminokinuklidinijev bromid (QNH₂-C₁₂)

Spoj ($\pm$)-*N*-dodecil-3-aminokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom ($\pm$)-3-aminokinuklidina (30 mg, 0,238 mmol) i 1-bromdodekana (0,057 mL, 0,238 mmol). Dobiveni je produkt oznake QNH₂-C₁₂, $M_r=375,44$, ($m=82,5$ mg, $\eta=92,44\%$), *t.t.* 162–164 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 0,86 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, H12'); 1,18–1,34 (m, 18H, H3'–H11'); 1,56–1,99 (m, 6H, H5, H8, H2'); 2,15–2,22 (m, 1H, H5); 2,91–2,97 (m, 1H H4); 3,13 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H, H1'); 3,23–3,50 (m, 6H, H6, H7, H2); 3,57–3,63 (m, H3).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 13,89 (C12'); 17,38, 21,24, 22,01, 22,40, 25,84, 28,37–29,03, 31,21 (C2'–C11', C5, C8); 26,01 (C4); 45,71 (C3); 52,94, 53,54 (C6, C7); 60,63, 62,94 (C2, C1').

3.1.1.11. ($\pm$)-*N*-Tetradecil-3-aminokinuklidinijev bromid (QNH₂-C₁₄)

Spoj ($\pm$)-*N*-tetradecil-3-aminokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom ($\pm$)-3-aminokinuklidina (30 mg, 0,238 mmol) i 1-bromtetradekana (0,065 mL, 0,238 mmol). Dobiveni je produkt oznake QNH₂-C₁₄, $M_r=403,49$, ($m=94,5$ mg, $\eta=98,52\%$), *t.t.* 195–198 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 0,86 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, H14'); 1,18–1,36 (m, 22H, H3'–H13'); 1,56–1,95 (m, 6H, H5, H8, H2'); 2,16–2,23 (m, 1H, H5); 2,84–2,90 (m, H4); 3,12 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H, H1'); 3,22–3,45 (m, 6H, H6, H7, H2); 3,55–3,61 (m, H3).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 13,94 (C14'); 17,42, 21,27, 22,04, 22,46, 25,87, 28,46–29,01, 31,25 (C2'–C13', C5, C8); 26,61 (C4); 45,85 (C3); 52,91, 53,61 (C6, C7); 61,50, 62,94 (C2, C1').

3.1.1.12. ($\pm$)-*N*-Heksadecil-3-aminokinuklidinijev bromid (QNH₂-C₁₆)

Spoj ($\pm$)-*N*-heksadecil-3-aminokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom ($\pm$)-3-aminokinuklidina (38,5 mg, 0,305 mmol) i 1-bromheksadekana (0,093 mL, 0,305 mmol). Dobiveni je produkt oznake QNH₂-C₁₆, $M_r=431,55$, ($m=128,9$ mg, $\eta=97,91\%$), *t.t.* 206–208 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 0,86 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, H16'); 1,16–1,38 (m, 26H, H3'–H15'); 1,57–2,01 (m, 6H, H5, H8, H2'); 2,16–2,26 (m, 1H, H5); 2,84–2,90 (m, H4); 3,09–3,45 (m, 8H, H6, H7, H2, H1'); 3,55–3,61 (m, H3).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 13,47 (C16'); 17,21, 21,69, 21,97, 25,62, 28,17–28,75, 30,97 (C2'–C15', C5, C8); 23,81 (C4); 45,35 (C3); 53,11, 53,61 (C6, C7); 61,50, 63,19 (C2, C1').

3.1.1.13. Dodecil-3-oksokinuklidinijev bromid (**QO-C₁₂**)

Spoj (*N*)-dodecil-3-oksokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom kinuklidin-3-ona (100,5 mg, 0,803 mmol) i 1-bromdodekana (0,192 mL, 0,803 mmol). Dobiveni je produkt oznake QO-C₁₂, $M_r=374,41$, ($m=295,96$ mg, $\eta=98,45\%$), *t.t.* 236–238 °C.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃-*d*) δ /ppm: 1,96 (2H, *s*, QH-2/2'), 3,99 (4H, *m*, QH-6 i H-7), 1,98 (2H, *m*, H-1/1'), 1,00 (1H, kvint, $J = 3,01$ Hz, QH-4), 2,11–2,07 (4H, *m*, QH-5 i QH-8), 4,20 (2H, *m*, H-2), 4,41 (4H, *m*, H-3, H-4), 15,81 (14H, *m*, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11), 3,22 (3H, *t*, $J = 7,03$ Hz, H-12, CH₃).

¹³C NMR (600 MHz, CDCl₃-*d*) δ /ppm: 201,3 (3C, QC=O), 65,86 (1C, QC-2), 64,44 (1C, C-1), 54,76 (2C, QC-6 i QC-7), 37,19 (1C, QC-4), 31,92 (1C, C-2), 29,62 (6C, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 26,36 (1C, C-9), 22,70 (2C, C-10, C-11), 21,32 (2C, QC-5 i QC-8), 14,15 (1C, C-12, CH₃).

3.1.1.14. Tetradecil-3-oksokinuklidinijev bromid (**QO-C₁₄**)

Spoj (*N*)-tetradecil-3-oksokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom kinuklidin-3-ona (100,5 mg, 0,901 mmol) i 1-bromtetradekana (0,245 mL, 0,901 mmol). Dobiveni je produkt oznake QO-C₁₄, $M_r=402,46$, ($m=344,80$ mg, $\eta=95,07\%$), *t.t.* 243–245 °C.

¹H NMR (150 MHz, CDCl₃-*d*) δ /ppm: 4,68 (2H, *s*, QH-2/2'), 4,13–3,97 (4H, *m*, QH-6 i H-7), 3,77–3,72 (2H, *m*, H-1/1'), 2,82 (1H, kvint, $J = 3,01$ Hz, QH-4), 2,49–2,32 (4H, *m*, QH-5 i QH-8), 1,84–1,77 (2H, *m*, H-2), 1,42–1,32 (4H, *m*, H-3, H-4), 1,32–1,21 (18H, *m*, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 0,88 (3H, *t*, $J = 7,03$ Hz, H-14, CH₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃-*d*) δ /ppm: 201,3 (3C, QC=O), 66,1 (1C, QC-2), 64,6 (1C, C-1), 54,9 (2C, QC-6 i QC-7), 37,4 (1C, QC-4), 32,1 (1C, C-2), 29,88 (1C, C-3), 29,85 (2C, C-4, C-5), 29,82 (1C, C-6), 29,7 (1C, C-7), 29,63 (1C, C-8), 29,55 (1C, C-9), 29,4 (1C, C-10), 26,6 (1C, C-11), 22,87 (1C, C-12), 22,86 (1C, C-13), 21,5 (2C, QC-5 i QC-8), 14,3 (1C, C-14, CH₃).

3.1.1.15. Heksadecil-3-oksokinuklidinijev bromid (**QO-C₁₆**)

Spoj (*N*)-heksadecil-3-oksokinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom kinuklidin-3-ona (123,40 mg, 0,986 mmol) i 1-bromheksadekana (0,301

mL, 0,986 mmol). Dobiveni je produkt oznake QO-C₁₆, $M_r=430,52$, ($m=420,30$ mg, $\eta=99,03\%$), *t.t.* 252–254 °C.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃-*d*) δ /ppm: 1,96 (2H, *s*, QH-2/2'), 1,99–2,03 (4H, *m*, QH-6 i H-7), 1,98 (2H, *m*, H-1/1'), 1,00 (1H, kvint, $J=3,01$ Hz, QH-4), 2,04–2,07 (4H, *m*, QH-5 i QH-8), 2,89 (2H, *m*, H-2), 4,40 (4H, *m*, H-3, H-4), 23,56 (22H, *m*, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15), 3,15 (3H, *t*, $J=7,03$ Hz, H-16, CH₃).

¹³C NMR (600 MHz, CDCl₃-*d*) δ /ppm: 201,04 (3C, QC=O), 65,88 (1C, QC-2), 64,40 (1C, C-1), 54,73 (2C, QC-6 i QC-7), 37,22 (1C, QC-4), 31,94 (11C, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 26,38 (1C, C-13), 22,70 (2C, C-14, C-15), 21,33 (2C, QC-5 i QC-8), 14,15 (1C, C-16, CH₃).

Sinteza QACs ($\pm$)-3-aminokinuklidina s *N*-alkil-2-bromacetamidima

Odgovarajući amini, dodecilamin, tetradecilamin i heksadecilamin, otopljeni su u suhom diklormetanu. Zatim je vodena otopina kalijeva karbonata dodana organskoj otopini s aminom, a reakcijska smjesa je se hladila na 5 °C. Bromacetil-bromid, otopljen u suhom diklormetanu, dodavan je polako tijekom 30 minuta u reakcijsku smjesu. Nakon što je cijeli bromacetil-bromid dodan, smjesa je ostavljena na miješanju pri sobnoj temperaturi tijekom sljedeća 4 sata. Organski sloj odvojen je u lijevku za odjeljivanje i ekstrahiran s diklormetanolom (2×5 mL). Spojeni organski ekstrakti isprani su vodom (3×10 mL), a prikupljeni organski slojevi osušeni su sa bezvodnim natrijevim sulfatom, koji je kasnije uklonjen filtriranjem. Nakon sušenja, otapalo je uklonjeno uparavanjem na rotavaporu, čime je dobiven odgovarajući amid koji je poslužio kao prekursor za prethodno opisanu sintezu serije QACs ($\pm$)-3-aminokinuklidina. Tijek kemijske reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) u sustavu otapala kloroform:metanol (CHCl₃:MeOH=10:1). Kako bi se postigla odgovarajuća čistoća proizvoda, provedena je ponovljena kristalizacija iz odgovarajućeg otapala, nakon čega je otapalo uklonjeno isparavanjem na rotacijskom isparivaču.

Reakcija kvaternizacije 3-aminokinuklidina provedena je u suhom acetonitrilu pod refluksom, uz kontinuirano miješanje, u prisutnosti ekvimolarne količine prethodno sintetiziranih kvaternizirajućih reagensa: *N*-dodecil-2-bromacetamida, *N*-tetradecil-2-bromacetamida i *N*-heksadecil-2-bromacetamida. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) u sustavu otapala kloroform: metanol (CHCl₃:MeOH=5:1). Radi postizanja odgovarajuće čistoće,

dobiveni produkti pročišćeni su ponovljenom kristalizacijom iz odgovarajućeg otapala, nakon čega je otapalo uklonjeno isparavanjem pod sniženim tlakom na rotacijskom isparivaču.

3.1.1.16. (±)-3-amino-1-(2-(dodecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev
bromid (QNH₂-ADC₁₂)

Spoj (±)-3-amino-1-(2-(dodecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom (±)-3-aminokinuklidina (20 mg, 0,158 mmol) i *N*-dodecil-bromacetamida (48,54 mg, 0,158 mmol). Dobiveni je produkt oznake QNH₂-ADC₁₂, *M_r*=432,49, (*m*=61,40 mg, *η*=89,58%), *t.t.* 56–59 °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 0.86 (t, *J*=6.9 Hz, 3H, H12'), 1.21–1.31 (*m*, 20H, H2'–H11'), 1.42–1.96 (*m*, 6H, H5, H8, H1'), 2.91–2.97 (*m*, 1H, H4), 3.12–3.53 (*m*, 6H, H6, H7, H2), 3.55–3.62 (*m*, 1H, H3), 4.76 (*s*, 2H, CH₂CO).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 14.26 (C12'), 22.01, 22.40, 25.84, 28.33–29.24, 31.21, 27.30 (C4), 48.03 (C3), 52.94, 53.54, 60.12, 63.94 (C2, CH₂CO), 170,58 (C=O).

Spoj *N*-dodecil-bromacetamid je dobiven prema prethodno opisanom postupku u 7.2.3. reakcijom dodecilamina (91,83 mg, 0,495 mmol) i bromacetil-bromida (0,043 mL, 0,495 mmol). Dobiveni je produkt oznake ADC₁₂, *M_r*=306,29, (*m*=79,20 mg, *η*=52,19%), *t.t.* 45–47 °C.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 0.88 (t, *J*=6.9 Hz, 3H, H12'), 1.18–1.31 (*m*, 20H, H2'–H11'), 3.20–3.33 (*m*, 2H, H1'), 3.89 (*s*, 2H, CH₂Br).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 14.12 (C12'), 22,70, 26.43, 27.03, 28.31–29.65, 31,93, 40.04, 162,62(C=O).

3.1.1.17. (±)-3-amino-1-(2-(tetradecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev
bromid (QNH₂-ADC₁₄)

Spoj (±)-3-amino-1-(2-(tetradecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom (±)-3-aminokinuklidina (20 mg, 0,158 mmol) i *N*-tetradecil-bromacetamida (52,98 mg, 0,158 mmol). Dobiveni je produkt oznake QNH₂-ADC₁₄, *M_r*=460,55, (*m*=29,20 mg, *η*=40,01%), *t.t.* 60–63 °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 0.86 (t, *J*=6.9 Hz, 3H, H14'), 1.20–1.34 (*m*, 24H, H2'–H13'),

1.50-1.99 (*m*, 6H, H5, H8, H1'), 2.90-2.96 (*m*, 1H, H4), 3.23-3.50 (*m*, 6H, H6, H7, H2), 3.57-3.63 (*m*, 1H, H3), 4.77 (*s*, 2H, CH₂CO).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 14.28 (C14'), 22.02, 22.39, 25.82, 28.36-29.33, 31.18 27.01 (C4), 48.11 (C3), 53.01, 53.61, 60.25, 64.15 (C2, CH₂CO), 170,57 (C=O).

Spoj *N*-tetradecil-bromacetamid je dobiven prema prethodno opisanom postupku u 7.2.3. tetradecilamina (105,73 mg, 0,495 mmol) i reakcijom bromacetil-bromida (0,043 mL, 0,495 mmol). Dobiveni je produkt oznake ADC₁₄, *M_r*=334,34, (*m*=71,70 mg, η =43,29%), *t.t.* 67-70 °C.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 0.88 (*t*, *J*=6.9 Hz, 3H, H14'), 1.20-1.31 (*m*, 24H, H2'-H11'), 3.19-3.34 (*m*, 2H, H1'), 3.88 (*s*, 2H, CH₂Br).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 14.13 (C14'), 22,70, 26.82, 27.03, 29.01-29.73, 31,93, 40.29, 162,62(C=O).

3.1.1.18. ($\pm$)-3-amino-1-(2-(heksadecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev bromid (**QNH₂-ADC₁₆**)

Spoj ($\pm$)-3-amino-1-(2-(heksadecilamino)-2-oksoetil)kinuklidinijev bromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom ($\pm$)-3-aminokinuklidina (20 mg, 0,158 mmol) i *N*-heksadecil-bromacetamida (57,43 mg, 0,158 mmol). Dobiveni je produkt oznake QNH₂-ADC₁₆, *M_r*=488,60, (*m*=62,50 mg, η =80,72%), *t.t.* 77-80 °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 0.87 (*t*, *J*=6.9 Hz, 3H, H16'), 1.19-1.34 (*m*, 28H, H2'-H15'), 1.51-1.99 (*m*, 6H, H5, H8, H1'), 2.92-2.98 (*m*, 1H, H4), 3.18-3.51 (*m*, 6H, H6, H7, H2), 3.55-3.61 (*m*, 1H, H3), 4.73 (*s*, 2H, CH₂CO).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 14.21 (C16'), 21.99, 22.42, 25.83, 28.31-29.42, 31.20 27.16 (C4), 48.12 (C3), 52.93, 53.52, 60.15, 64.09 (C2, CH₂CO), 170,57 (C=O).

Spoj *N*-heksadecil-bromacetamid je dobiven prema prethodno opisanom postupku u 7.2.3. reakcijom heksadecilamina (200 mg, 0,828 mmol) i bromacetil-bromida (0,072 mL, 0,828 mmol). Dobiveni je produkt oznake ADC₁₆, *M_r*=362,40, (*m*=134 mg, η =44,64%), *t.t.* 77-80 °C.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 0.88 (*t*, *J*=6.9 Hz, 3H, H16'), 1.17-1.32 (*m*, 28H, H2'-H11'), 3.18-3.32 (*m*, 2H, H1'), 3.80 (*s*, 2H, CH₂Br).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 14.12 (C16'), 22.70, 26.99, 27.21, 29.22-29.88, 31,94 42.08, 170,40 (C=O).

3.1.2. Sinteza bisQACs

Sinteza bisQACs kinuklidin-3-ona s različitim duljinom poveznica

Odvagana količina kinuklidin-3-ona otopljena je u suhom acetonu, uz dodatak odgovarajućeg dialkil halogenida (1,3-dibrompropan, 1,4-dibrombutan i 1,6-dibromheksan) u stehiometrijskom omjeru 1:2, u korist kinuklidin-3-ona. Kako bi se osigurala inertnost kemijske reakcije kvaternizacije, reakcija je provedena u balonu pod dušikovom atmosferom (N₂) i ostavljena na miješanju tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi. Tijek kemijske reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) na aloksu u sustavu otapala kloroform:metanol (CHCl₃:MeOH = 1:1). Obrada reakcijske smjese uključivala je uparavanje otapala na rotavaporu, nakon čega je smjesa višestruko isprana s Et₂O kako bi se postigla željena čistoća produkta. Produkti su dobiveni kao bijeli prah.

3.1.2.4. 1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid (**2(QO)₃**)

Spoj 1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom kinuklidin-3-ona (68,10 mg, 0,544 mmol) i 1,3-dibrompropana (0,028 mL, 0,272 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QO)₃, *M_r*=452,23, (*m*=118,10 mg, *η*=96%), *t.t.* 254–256 °C.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) *δ*/ppm: 1,91 - 2,07 (*m*, 4 H) 2,11 - 2,29 (*m*, 5 H) 2,30 - 2,40 (*m*, 5 H) 3,33 - 3,62 (*m*, 14 H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄) *δ*/ppm: 17,5 (C3') 21,2 (C5) 21,5 (C7) 26,3; 29,5; 31,0 (C4) 55,6; 55,7; 55,8; 56,0; 61,6 (C8) 64,1 (C2) 201,1 (C=O).

3.1.2.5. 1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid (**2(QO)₄**)

Spoj 1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom kinuklidin-3-ona (100 mg, 0,799 mmol) i 1,4-dibrombutana (0,048 mL, 0,399 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QO)₄, *M_r*=466,26, (*m*=172,50 mg, *η*=92,62%), *t.t.* 260–263 °C.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) *δ*/ppm: 1,91 - 2,07 (*m*, 4 H) 2,11 - 2,29 (*m*, 5 H) 2,30 - 2,40 (*m*, 5 H) 3,33 - 3,62 (*m*, 14 H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄) *δ*/ppm: 17,5 (C3') 19,8 (C4')

21,2 (C5) 21,5 (C7) 26,3; 29,5; 31,0 (C4) 55,6; 55,7; 55,8; 56,0; 61,6 (C8) 64,1 (C2) 201,1 (C=O).

3.1.2.6. 1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid (**2(QO)₆**)

Spoj 1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-oksokinuklidin) dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom kinuklidin-3-ona (65,40 mg, 0,522 mmol) i 1,6-dibromheksana (0,040 mL, 0,261 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QO)₆, $M_r=494,31$, ($m=123,60$ mg, $\eta=95,71\%$), *t.t.* 232–235 °C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 1,26 - 1,38 (*m*, 4 H, H3', H4') 1,67 - 1,79 (*m*, 4 H, H2', H5') 2,03 - 2,14 (*m*, 4 H, H5) 2,21 - 2,33 (*m*, 4 H, H7) 2,67 - 2,75 (*m*, 2 H, H4) 3,36 - 3,44 (*m*, 4 H, H1', H6') 3,55 - 3,65 (*m*, 4 H, H6) 3,65 - 3,77 (*m*, 4 H, H8) 4,25 - 4,30 (*m*, 4 H, H2); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 20,7 (C3', C4') 21,1 (C5) 21,2 (C7) 24,9; 25,2; 27,0; 31,8; 35,0; 36,8 (C4) 53,9 (C1', C6') 62,9 (C6) 63,1 (C8) 64,8 (C2) 203,2 (C=O).

Kao potvrdu uspješne sinteze biskvaternih amonijevih soli kinuklidin-3-ona s različitim duljinama poveznica, provedena je testna reakcija taloženja bromidnih iona pomoću otopine srebrovog nitrata (AgNO₃). Ova metoda temelji se na visokoj afinitetnoj interakciji između bromidnih aniona i Ag⁺ iona, pri čemu dolazi do stvaranja teško topljivog srebrovog bromida (AgBr). S obzirom na strukturnu karakteristiku biskvaternih soli, koje sadrže dva bromidna aniona po molekuli, očekivano je taloženje dvostruke količine AgBr u odnosu na odgovarajuće monokvaterne analoge.

Eksperimentalno, nakon dodatka AgNO₃ u otopinu sintetiziranog spoja, opažena je značajno veća količina taloga, što je u skladu s teorijskim očekivanjima i potvrđuje prisutnost dvostrukog broja bromidnih aniona.

Provedena testna reakcija taloženja bromidnih iona pomoću srebrovog nitrata (AgNO₃) rezultirala je formiranjem dvostruko veće količine taloga srebrovog bromida (AgBr) u odnosu na monokvaterne spojeve. Dobiveni rezultat potvrđuje prisutnost dvostrukog broja bromidnih iona u sintetiziranom spoju, što je u skladu s teorijskim izračunom očekivane količine bromidnih aniona. Time je test taloženja uspješno poslužio kao preliminarna eksperimentalna potvrda kvaternizacije.

Sinteza bisQACs kinuklidin-3-ona s alkilnim lancima

Odvagana količina odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona s odgovarajućom duljinom poveznice, otopljena je u metanolu, uz dodatak stehiometrijske količine odgovarajućeg amina (dodecilamin, tetradecilamin, heksadecilamin) u omjeru 1:2, u korist amina. Nakon toga, u reakcijsku smjesu je dodana stehiometrijska količina redukcijskog sredstva NaBH_3CN , otopljenog u metanolu, u odnosu na dobivenu biskvaternu amonijevu sol. Reakcijska smjesa podvrgnuta je zagrijavanju uz refluks tijekom 4 dana, uz kontinuirano miješanje. Tijek kemijske reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) na aloksu u sustavu otapala diklormetan:metanol (DCM:MeOH=9:1). Po završetku reakcije, otapalo je upareno na rotavaporu, a nastali ljepljivi talog ispran je suhim Et_2O kako bi se postigla željena čistoća produkta.

3.1.2.7. ($\pm$)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₂)₃**))**

Spoj ($\pm$)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,111 mmol) i dodecilamina (40,96 mg, 0,221 mmol) te redukcijskog sredstva NaBH_3CN (6,95 mg, 0,111 mmol). Dobiveni je produkt oznake **2(QC₁₂)₃**, $M_r=790,94$, ($m=80,70$ mg, $\eta=92,28\%$).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ /ppm: 0,85 (*t*, $J=6,7$ Hz, 6 H, H12") 1,24 (*s*, 36 H) 1,33 - 1,44 (*m*, 4 H, H2") 1,69 - 1,85 (*m*, 4 H, H1") 1,86 - 1,99 (*m*, 2 H) 2,02 - 2,09 (*m*, 2 H) 2,13 (*br s*, 2 H) 2,32 - 2,48 (*m*, 2 H) 2,54 - 2,70 (*m*, 2 H) 2,85 - 3,13 (*m*, 4 H) 3,13 - 3,26 (*m*, 4 H) 3,27 - 3,48 (*m*, 10 H) 3,58 - 3,75 (*m*, 2 H) 3,83 - 3,88 (*m*, 1 H) 4,03 - 4,13 (*m*, 2 H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ /ppm: 14,4 (C12"); 15,5; 15,5; 17,3; 18,9; 19,6; 20,8; 20,9; 22,1; 25,7; 26,3; 26,8; 26,9; 28,66; 28,69; 28,96; 28,99; 29,0; 29,8; 31,3; 37,0; 46,1; 46,5; 53,2; 54,2; 54,7; 62,6 (C2); 63,4 (C3).

3.1.2.8. ($\pm$)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev dibromid (2(QC₁₄)₃**))**

Spoj ($\pm$)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,111 mmol) i tetradecilamina (47,18 mg, 0,221 mmol) te redukcijskog sredstva NaBH_3CN

(6,94 mg, 0,111 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QC₁₄)₃, $M_r=847,05$, ($m=80,90$ mg, $\eta=86,39\%$).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 0,85 (*t*, $J=6,7$ Hz, 6 H, H14") 1,19 – 1,30 (*m*, 44 H) 1,35 – 1,41 (*m*, 4 H) 1,70 - 1,85 (*m*, 6 H) 1,89 – 1,97 (*m*, 4 H) 2,03 - 2,08 (*m*, 2 H) 2,10 – 2,21 (*m*, 4 H) 2,84 – 2,97 (*m*, 2 H) 2,99 – 3,11 (*m*, 4 H) 3,13 - 3,26 (*m*, 8 H) 3,37 - 3,47 (*m*, 2 H) 3,59 – 3,75 (*m*, 3 H) 3,84 – 3,88 (*m*, 1 H) 4,05 – 4,12 (*m*, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 14,4 (C14"); 16,0; 17,8; 21,3; 21,4; 22,5; 22,6; 27,3; 29,2; 29,47; 29,51; 30,04; 30,14; 30,20; 31,76; 37,50; 39,38; 39,58; 39,8; 40,0; 40,2; 40,4; 40,6; 40,9; 53,1; 53,7; 54,7 (C4); 60,1; 62,1; 63,1 (C2); 63,8 (C3).

3.1.2.9. (±)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev dibromid (**2(QC₁₆)₃**)

Spoj (±)-1,1'-(propan-1,3-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,111 mmol) i heksadecilamina (53,39 mg, 0,221 mmol) te redukcijuskog sredstva NaBH₃CN (6,95 mg, 0,111 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QC₁₆)₃, $M_r=903,16$, ($m=34,60$ mg, $\eta=34,65\%$), *t.t.* 260-263 °C.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 0,76 - 0,84 (*m*, 6 H, H16") 1,15 - 1,29 (*m*, 54 H) 1,35 - 1,46 (*m*, 2 H) 1,74 - 1,92 (*m*, 4 H) 1,93 - 2,06 (*m*, 2 H) 2,07 – 2,12 (*m*, 1 H) 2,13 - 2,29 (*m*, 2 H) 2,37 - 2,51 (*m*, 1 H) 3,00 - 3,17 (*m*, 4 H) 3,23 (*s*, 1 H) 3,27 (*br s*, 1 H) 3,33 - 3,52 (*m*, 3 H) 3,52 - 3,63 (*m*, 1 H) 3,65 - 3,78 (*m*, 1 H) 4,07 - 4,19 (*m*, 1 H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 14,4 (C16"); 18,8; 21,6; 22,4; 22,4; 23,7; 25,2; 25,6; 28,5; 30,4; 30,5; 30,67; 30,71; 30,74; 30,77; 30,83; 33,1; 39,0; 40,5; 55,2; 56,4 (C4); 56,6; 61,6; 62,9; 63,5; 65,4 (C3); 70,9 (C2).

3.1.2.10. (±)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid (**2(QC₁₂)₄**)

Spoj (±)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,107 mmol) i dodecilamina (39,75 mg, 0,214 mmol) te redukcijuskog sredstva NaBH₃CN (6,74 mg, 0,107 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QC₁₂)₄, $M_r=804,97$, ($m=84,26$ mg, $\eta=97,61\%$).

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 0,82 - 0,96 (*m*, 6 H, H12") 1,11 (*m*, 4 H) 1,25 – 1,40 (*m*, 38 H) 1,42 - 1,63 (*m*, 4 H) 1,76 – 1,84 (*m*, 4 H) 1,86 - 1,98 (*m*, 4 H) 2,02 – 2,13 (*m*, 2 H) 2,16 - 2,40 (*m*, 4 H) 2,97 - 3,20 (*m*, 6 H) 3,37 – 3,51 (*m*, 8 H) 3,63 - 3,77 (*m*, 2 H) 4,18 - 4,25 (*m*, 1 H); ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 14,4 (C12") 18,8; 20,4; 22,4; 23,7; 28,0; 28,5; 30,4; 30,5; 30,7; 30,8; 31,0; 33,1; 54,2 (C4) 55,0; 56,2; 64,3; 64,7 (C2) 65,4 (C3).

3.1.2.11. ($\pm$)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev
dibromid (**2(QC₁₄)₄**)

Spoj ($\pm$)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,107 mmol) i tetradecilamina (45,77 mg, 0,214 mmol) te redukcijskog sredstva NaBH₃CN (6,74 mg, 0,107 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QC₁₄)₄, M_r =861,08, (m =64,90 mg, η =70,28%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 0,75 - 0,84 (*m*, 6 H, H14") 1,13 - 1,30 (*m*, 44 H) 1,37 – 1,54 (*m*, 4 H) 1,66 - 1,89 (*m*, 6 H) 1,92 - 2,04 (*m*, 2 H) 2,05 - 2,16 (*m*, 2 H) 2,19 – 2,28 (*m*, 1 H) 2,52 - 2,63 (*m*, 2 H) 3,01 - 3,13 (*m*, 4 H) 3,25 - 3,40 (*m*, 8 H) 3,57 – 3,62 (*m*, 1 H) 4,04 - 4,20 (*m*, 1 H); ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 14,4 (C14") 18,8; 20,4; 22,4; 23,7; 27,9; 30,3; 30,5; 30,52; 30,66; 30,7; 30,71; 30,75; 30,77; 30,8; 32,3; 33,1; 39,0; 42,0; 54,2 (C4) 55,0; 56,2; 64,3; 64,7 (C2) 65,4 (C3).

3.1.2.12. ($\pm$)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev
dibromid (**2(QC₁₆)₄**)

Spoj ($\pm$)-1,1'-(butan-1,4-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,107 mmol) i heksadecilamina (51,78 mg, 0,214 mmol) te redukcijskog sredstva NaBH₃CN (6,74 mg, 0,107 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QC₁₆)₄, M_r =917,19, (m =75,70 mg, η =76,96%), *t.t.* 333-335 °C.

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 0,85 - 0,94 (*m*, 6 H, H16") 1,24 - 1,39 (*m*, 54 H, H2"-H15") 1,41 – 1,47 (*m*, 4 H) 1,48 - 1,58 (*m*, 3 H) 1,71 - 1,83 (*m*, 4 H) 1,83 - 1,98 (*m*, 4 H) 2,02 - 2,13 (*m*, 2 H) 2,16 - 2,20 (*m*, 1 H) 2,21 - 2,39 (*m*, 4 H) 3,09 - 3,24 (*m*, 6 H) 3,33 - 3,49 (*m*, 7 H)

3,63 – 3,75 (*m*, 2 H) 4,18 - 4,25 (*m*, 2 H); ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 14,4 (C16") 18,8; 20,4; 22,4; 23,7; 27,9; 30,3; 30,4; 30,5; 30,54; 30,6; 30,68; 30,70; 30,72; 30,76; 30,77; 30,79; 32,5; 33,1; 39,0; 42,1; 54,2 (C4) 55,0; 56,2; 64,3; 64,7 (C2) 65,4 (C3).

3.1.2.13. ($\pm$)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid (**2(QC₁₂)₆**)

Spoj ($\pm$)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(dodecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,101 mmol) i dodecilamina (37,50 mg, 0,202 mmol) te redukcijskog sredstva NaBH₃CN (6,36 mg, 0,101 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QC₁₂)₆, *M_r*=833,02, (*m*=81,16 mg, η =96,32%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 0,80 (*t*, *J*=6,8 Hz, 6 H, H12") 1,13 - 1,26 (*m*, 36 H) 1,27 - 1,48 (*m*, 12 H) 1,51 - 1,61 (*m*, 2 H) 1,63 - 1,74 (*m*, 4 H) 1,75 - 1,91 (*m*, 4 H) 1,92 - 2,05 (*m*, 2 H) 2,06 - 2,15 (*m*, 2 H) 2,18 - 2,28 (*m*, 2 H) 3,00 - 3,07 (*m*, 2 H) 3,07 - 3,17 (*m*, 5 H) 3,23 - 3,44 (*m*, 8 H) 3,55 - 3,68 (*m*, 2 H) 4,08 - 4,16 (*m*, 1 H); ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 14,4 (C12") 18,8; 22,4; 22,7; 23,7; 26,8; 27,9; 28,1; 28,5; 30,27; 30,29; 30,35; 30,46; 30,6; 30,66; 30,70; 30,74; 30,76; 30,78; 33,1; 39,0; 54,2 (C4); 54,8; 56,0; 64,6; 65,1 (C2); 65,5 (C3).

3.1.2.14. ($\pm$)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev dibromid (**2(QC₁₄)₆**)

Spoj ($\pm$)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(tetradecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,101 mmol) i tetradecilamina (43,17 mg, 0,202 mmol) te redukcijskog sredstva NaBH₃CN (6,36 mg, 0,101 mmol). Dobiveni je produkt oznake 2(QC₁₄)₆, *M_r*=889,32, (*m*=88,90 mg, η =98,82%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 0,90 (*t*, *J*=6,8 Hz, 6 H, H14") 1,26 - 1,36 (*m*, 48 H) 1,42 - 1,47 (*m*, 4 H) 1,51 - 1,56 (*m*, 4 H) 1,71 - 1,82 (*m*, 4 H) 1,84 - 1,97 (*m*, 4 H) 2,15 - 2,20 (*m*, 2 H) 3,09 - 3,24 (*m*, 8 H) 3,34 - 3,48 (*m*, 10 H) 3,64 - 3,75 (*m*, 3H) 4,18 - 4,24 (*m*, 2 H); ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 14,4 (C14") 18,8; 22,4; 22,7; 23,7; 26,8; 27,9; 30,47; 30,51; 30,6; 30,71; 30,76; 30,77; 30,79; 32,1; 33,1; 42,00; 54,3 (C4); 54,8; 56,0; 64,6; 65,2 (C2) 65,5 (C3).

3.1.2.15. (±)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev dibromid (**2(QC₁₆)₆**)

Spoj (±)-1,1'-(heksan-1,6-diil)bis(3-(heksadecilamino)kinuklidinijev dibromid je dobiven prema prethodno opisanom postupku reakcijom odgovarajućeg biskvaternog kinuklidin-3-ona (50 mg, 0,101 mmol) i heksadecilamina (48,85 mg, 0,202 mmol) te redukcijskog sredstva NaBH₃CN (6,36 mg, 0,101 mmol). Dobiveni je produkt oznake **2(QC₁₆)₆**, *M_r*=945,24, (*m*=56 mg, *η*=58,57%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) *δ*/ppm: 0,86 - 0,93 (*m*, 6 H, H16") 1,23 - 1,39 (*m*, 54 H) 1,43 – 1,46 (*m*, 4 H) 1,48 - 1,58 (*m*, 4 H) 1,71 - 1,83 (*m*, 4 H) 1,83 - 1,98 (*m*, 4 H) 2,02 - 2,13 (*m*, 2 H) 2,16 - 2,20 (*m*, 2 H) 2,21 - 2,39 (*m*, 4 H) 3,09 - 3,24 (*m*, 6 H) 3,33 - 3,49 (*m*, 8 H) 3,64 - 3,75 (*m*, 2 H) 4,18 - 4,25 (*m*, 2 H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄) *δ*/ppm: 14,4 (C16"); 18,8; 22,4; 22,7; 23,7; 26,8; 27,9; 30,3; 30,3; 30,47; 30,52; 30,66; 30,70; 30,75; 30,77; 30,78; 30,9; 32,2; 33,1; 39,0; 42,0; 54,2 (C4); 54,8; 56,0; 64,6; 65,1 (C2); 65,4 (C3).

3.2. Evaluacija amfifilnih i farmakokinetičkih svojstava spojeva

3.2.1. Odnos strukture i aktivnosti

Kristalna struktura transkripcijskog regulatornog proteina QacR, koji veže različite lijekove, u kompleksu s malahitno zelenom bojom (PDB ID: 1JUP), preuzeta je iz baze podataka Protein Data Bank. Prije provođenja molekulskih simulacija uklonjene su sve molekule vode i heteroatomi kako bi se spriječilo ometanje vezanja liganda. Protein je pripremljen dodavanjem atoma vodika i dodjeljivanjem Kollmanovih naboja pomoću programa AutoDock Tools, pri čemu su osigurana odgovarajuća protonacijska stanja potrebna za simulacije. Strukture liganada bisQACs generirane su u programu Open Babel, pri čemu su konstruirane trodimenzionalne konformacije te dodani atomi vodika. Svaki je ligand podvrgnut minimizaciji energije primjenom MMFF94 polja sila u 5000 iteracija kako bi se optimizirala geometrija. Optimizirani ligandi potom su konvertirani u PDBQT format potreban za AutoDock Vina. Mrežna kutija za simulacije centrirana je na koordinatama veznog mjesta QacR proteina (*X* = 121,552; *Y* = 49,539; *Z* = 79,909), a dimenzije su odabrane tako da obuhvate cijelo aktivno mjesto,

omogućujući fleksibilnost liganda tijekom molekularne simulacije. Molekularne simulacije provedene su pomoću programa AutoDock Vina, verzija 1.2.7, pri čemu je parametar iscrpnosti postavljen na 32 kako bi se osiguralo sveobuhvatno ispitivanje mogućih položaja liganda. Svaki bisQAC spoj simuliran je u tri ponavljanja radi zajamčene ponovljivosti i statističke pouzdanosti predviđenih načina vezanja i afiniteta. Najbolje rangirani položaji liganada vizualizirani su i analizirani u programu PyMOL kako bi se istražile ključne interakcije između bisQAC liganada i aktivnog mjesta QacR proteina, čime su dobiveni uvidi u potencijalne molekularne odrednice veznog afiniteta.

Kvantitativni podaci o afinitetu vezanja za bisQACs analizirani su pomoću jednosmjerne parametarske analize varijance (ANOVA) radi procjene statistički značajnih razlika između skupina. Nakon dobivanja značajnog rezultata ANOVA-e, primijenjen je Tukeyjev post-hoc test višestrukih usporedbi kako bi se utvrdile specifične međugrupne razlike uz kontrolu ukupne stope pogreške.

Distribucija podataka i varijabilnost prikazani su vizualno pomoću box-and-whiskers dijagrama, koji ilustriraju medijan, interkvartilni raspon i cjelokupan raspon podataka. Sve statističke analize i grafički prikazi izvedeni su korištenjem GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Statistička značajnost određena je na razini $p < 0,05$. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija, osim ako nije drugačije navedeno.

3.2.2. Određivanje kritične micelarne koncentracije

Mjerenja električne vodljivosti provedena su prema prethodno opisanoj metodi.¹¹⁴ Svi eksperimenti provedeni su pri konstantnoj temperaturi od $(25 \pm 0,01)$ °C koristeći Orion metar za električnu vodljivost (model 018001) opremljen platinastim elektrodama. Konstanta ćelije ($0,10501 \pm 0,00002 \text{ cm}^{-1}$) određena je kalibracijom s vodenim otopinama kalijeva klorida u koncentracijskom rasponu od 0,001 do 0,05 mol dm⁻³. Ćelija za električnu vodljivost bila je povezana s preciznim analizatorom komponenata (Wayne-Kerr, model 6430A). Otpor (R) ispitnih otopina mjerio se pri frekvencijama od 500, 800, 1000 i 2000 Hz. Ovisnost između otpora i recipročnih frekvencija bila je linearna. Eksperimentalni postupak započeo je

pripremom 10 cm³ ultračiste vode u staklenoj reakcijskoj ćeliji. Tragovi otopljenog CO₂ uklonjeni su kratkim propuhivanjem visokočistog dušika kroz otopinu. Reakcijska ćelija zatim je hermetički zatvorena teflon poklopcem i postavljena u termo-haake Circulator DC10-V15/B radi termalne ekvibracije. Nakon postizanja termalne ravnoteže, otpor otopine pri četiri frekvencije bio je zabilježen. Sljedeće, poznata količina koncentrirane otopine surfaktanta dodana je u ćeliju pomoću mikropipete, a mjerenja otpora su ponovljena. Između ta dva koraka, ispittivana otopina kratko je homogenizirana magnetskom miješalicom uz korištenje uronjivog miješala Cyclone (model 1-100, HMC Europe). Na temelju dobivenih vrijednosti, nacrtani su grafovi ovisnosti električne vodljivosti o koncentraciji spoja, a kritična koncentracija (cmc) izračunata je iz sjecišta pravaca. Za analizu podataka korišten je Microsoft Excel.

3.2.3. Izračun molekulskih deskriptora

cLogP i TPSA su osnovni molekulski deskriptori koji se koriste za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava i bioaktivnosti spojeva. Vrijednosti cLogP i topološke polarne površine (TPSA) izračunate su pomoću alata SwissADME (dostupnog na <http://www.swissadme.ch>, pristupljeno 23. siječnja 2025.), široko korištenog alata za procjenu fizikalno-kemijskih svojstava i podobnosti spojeva za lijekove. cLogP (izračunati oktanol-voda partijski koeficijent) odražava lipofilnost spoja, što je ključni faktor njegove sposobnosti prijelaza kroz biološke membrane. Viša vrijednost cLogP označava veću hidrofobnost, što može utjecati na apsorpciju, distribuciju i sposobnost molekule da prođe kroz stanične membrane. TPSA, izračunata putem alata SwissADME, predstavlja ukupnu površinu molekule koja je polarna, odnosno površinu koja se uglavnom pripisuje prisutnosti polarnih funkcionalnih skupina poput hidroksilnih, amino i karbonilnih skupina. Alat pritom uzima u obzir ne samo prisutnost polarnih atoma, već i njihov prostorni raspored i međusobnu povezanost unutar molekularne strukture, čime se omogućuje preciznija procjena ukupne polarne površine molekule. Kemijske strukture spojeva nacrtane su pomoću programa ChemDraw 16.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, USA), popularnog softverskog alata za crtanje kemijskih struktura, koji omogućava generiranje točnih SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) zapisa spoja. Ovi SMILES zapisi (navedene u tablici 2) zatim su korištene kao ulaz za izračune SwissADME-a. SMILES zapisi pružaju kompaktno, računarski čitljivo predstavljanje

molekularne strukture, što olakšava naknadnu računalnu analizu, uključujući izračune cLogP i TPSA. Nakon što su vrijednosti TPSA dobivene, one su vizualizirane pomoću Jmol-a (<http://jmol.sourceforge.net> - pristupljeno 23. siječnja 2025.), softverskog alata za vizualizaciju molekula s otvorenim izvorom. Jmol omogućava 3D vizualizaciju molekularnih struktura i svojstava, poput TPSA, u interaktivnom formatu. Isticanjem polarnih površina unutar molekularne strukture, Jmol pruža vizualizaciju područja koja mogu biti važna za topljivost spoja ili segmente koji su važni u interakciji s biološkim membranama, čime pomaže u razumijevanju potencijalne biološke aktivnosti i farmakokinetike spojeva.

Tablica 2. Popis kratica spojeva i pripadajućih SMILES zapisa korištenih za ADME izračune.

Kratica spoja	SMILES
QNH₂-C₁₂	<chem>NC1C[N@+](CCCCCCCCCCCC)CC[C@H]1CC2.[Br-]</chem>
QNH₂-C₁₄	<chem>NC1C[N@+](CCCCCCCCCCCCCCCC)CC[C@H]1CC2.[Br-]</chem>
QNH₂-C₁₆	<chem>NC1C[N@+](CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC)CC[C@H]1CC2.[Br-]</chem>
QNH₂-ADC₁₂	<chem>NC1C[N+](CC(NCCCCCCCCCCCCC)=O)CCC1CC2.[Br-]</chem>
QNH₂-ADC₁₄	<chem>NC1C[N+](CC(NCCCCCCCCCCCCCCC)=O)CCC1CC2.[Br-]</chem>
QNH₂-ADC₁₆	<chem>NC1C[N+](CC(NCCCCCCCCCCCCCCCCC)=O)CCC1CC2.[Br-]</chem>
QBn-C₁₂	<chem>O=C(C1=CC=CC=C1)NC2C[N@+](CCCCCCCCCCCC)CC[C@H]2CC3.[Br-]</chem>
QBn-C₁₄	<chem>O=C(C1=CC=CC=C1)NC2C[N@+](CCCCCCCCCCCCCCCC)CC[C@H]2CC3.[Br-]</chem>
QBn-C₁₆	<chem>O=C(C1=CC=CC=C1)NC2C[N@+](CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC)CC[C@H]2CC3.[Br-]</chem>
QAc-C₁₂	<chem>O=C(C)NC1C[N@+](CCCCCCCCCCCC)CC[C@H]1CC2.[Br-]</chem>
QAc-C₁₄	<chem>O=C(C)NC1C[N@+](CCCCCCCCCCCCCCCC)CC[C@H]1CC2.[Br-]</chem>
QAc-C₁₆	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC[N@+](C1)(CC2)CC[C@@H]2C(NC(C)=O)C1.[Br-]</chem>
QO-C₁₂	<chem>CCCCCCCCCCCC[N@+](C1)(CC2)CC[C@@H]2C1=O.[Br-]</chem>
QO-C₁₄	<chem>CCCCCCCCCCCC[N@+](C1)(CC2)CC[C@@H]2C1=O.[Br-]</chem>
QO-C₁₆	<chem>CCCCCCCCCCCC[N@+](C1)(CC2)CC[C@@H]2C1=O.[Br-]</chem>
2(QO)₃	<chem>O=C(C1)C2CC[N+](CCC[N+](C4)CCC(C(C4)=O)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QO)₄	<chem>O=C(C1)C2CC[N+](CCCC[N+](C4)CCC(C(C4)=O)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QO)₆	<chem>O=C(C1)C2CC[N+](CCCCC[N+](C4)CCC(C(C4)=O)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QC₁₂)₃	<chem>CCCCCCCCCCCCNCC(C1)C2CC[N+](CCC[N+](C4)CCC(C(NCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QC₁₂)₄	<chem>CCCCCCCCCCCCNCC(C1)C2CC[N+](CCCC[N+](C4)CCC(C(NCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QC₁₂)₆	<chem>CCCCCCCCCCCCNCC(C1)C2CC[N+](CCCCC[N+](C4)CCC(C(NCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QC₁₄)₃	<chem>CCCCCCCCCCCCNCC(C1)C2CC[N+](CCC[N+](C4)CCC(C(NCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QC₁₄)₄	<chem>CCCCCCCCCCCCNCC(C1)C2CC[N+](CCCC[N+](C4)CCC(C(NCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>

1-azabiciklo[2.2.2]oktana

2(QC₁₄)₆	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCNC(C1)C2CC[N+](CCCCC[N+])34CCC(C(NCCCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QC₁₆)₃	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCNC(C1)C2CC[N+](CCC[N+])34CCC(C(NCCCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QC₁₆)₄	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCNC(C1)C2CC[N+](CCCC[N+])34CCC(C(NCCCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
2(QC₁₆)₆	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCNC(C1)C2CC[N+](CCCCC[N+])34CCC(C(NCCCCCCCCCCCCC)C4)CC3)CC2.[Br-].[Br-]</chem>
CPC	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCC[N+]=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>
BAB	<chem>C[N+](CC1=CC=CC=C1)(C)CCCCCCCCCCCC.[Br-]</chem>
OCT	<chem>CCCCCCCCNC1=CC=[N+](CCCCCCCCC[N+])2=CC=C(NCCCCCCCC)C=C2)C=C1.[Cl-].[Cl-]</chem>

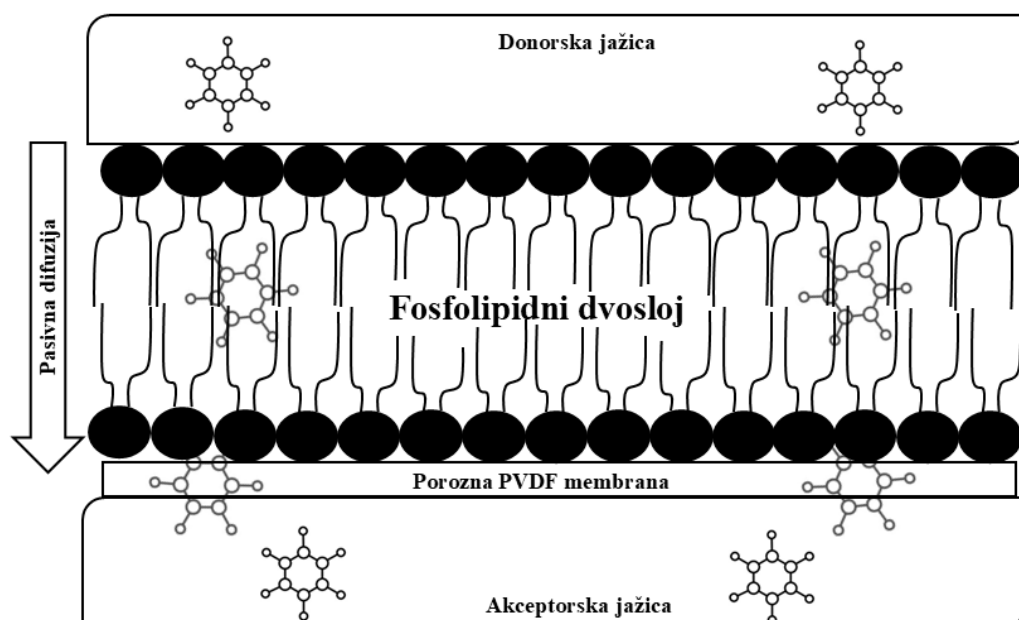
3.2.4. Procjena permeabilnosti spojeva

Za moguće korištenje novih spojeva kao antiseptika i/ili dezinficijensa, važno je ispitati njihovu moguću apsorpciju kroz epitel kože. Ovaj eksperiment bit će provedeni korištenjem testa PAMPA (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), koji mjeri propusnost sintetske membrane za odabrane spojeve.

Za pripremu eksperimenata, pripremljena je 1% otopina (w/v) lecitina koja će se u potpunosti otopiti u dodekanu uz pomoć ultrazvučne kupelji. Pažljivo će se otpipetirati 5 µL tako pripremljene otopine u svaku donorsku jažicu (MultiScreen-IP Filter Plate, 0,45 µM, Clear, Hydrophobic PVDF membrane, Millipore). Nakon dodavanja membrane, u svaku donorsku jažicu dodano je 150 µL spoja u 4% DMSO. Istovremeno, u svaku akceptorsku jažicu dodano je 300 µL 4% DMSO. Prema uputama proizvođača, donorska pločica postavlja se u akceptorsku kako bi se osigurao kontakt između donorskih i akceptorskih jažica. Tako pripremljena ploča inkubirana je 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, apsorpcijski spektar je očitao na spektrofotometru u rasponu valnih duljina od 190 do 400 nm.

Za procjenu integriteta membrane pripremljena je otopina briljantno krezil plava (BCB) i lucifer žuta (LY) u omjeru 9:1, a 150 µL te otopine dodano je u svaku donorsku jažicu, dok je u akceptorske jažice dodano 300 µL puferske otopine (4% DMSO u PBS). Nakon inkubacije od 3-4 sata na 37 °C, mjerena je apsorbancija na 610 nm kako bi se detektirala propusnost prema BCB boji, pri čemu su tipične vrijednosti u rasponu od 0,002 do 0,006, dok vrijednosti koje prelaze 0,012 upućuju na oštećenje membrane. Dodatno, mjerenja fluorescencije boje lucifer

žute (LY) u akceptorskim jažicama provedena su kako bi se potvrdio integritet membrane, pri čemu prihvatljiva fluorescencija ne smije prelaziti tri puta vrijednost prosječnog pozadinskog signala. Analiza podataka provedena je pomoću Microsoft Excela.



Slika 26. Shematski prikaz umjetne membrane u PAMPA testu (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) za procjenu pasivne permeabilnosti.

3.3. Biološka aktivnost

U ovom dijelu doktorske disertacije prikazana su biološka ispitivanja provedena primjenom mikrobioloških, biofizikalnih i molekularno-biokemijskih tehnika i metoda s ciljem utvrđivanja i potvrđivanja bioaktivnosti novosintetiziranih spojeva.

Jedan od ključnih parametara, uz nisku minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) antimikrobnih sredstava prema različitim bakterijskim sojevima, jest i njihova biosigurnost, odnosno mogućnost sigurne primjene kod ljudi. S obzirom na to da je primarni cilj ~~novih~~ ~~sinteza~~ postići visoku učinkovitost, stabilnost i sigurnost primjene novih spojeva u različitim formulacijama, uključujući topikalne pripravke poput antiseptika i dezinfekcijskih sredstava. Poznato je da kationski amfifilni spojevi (QACs) ostvaruju svoj mehanizam djelovanja

nespecifičnom interakcijom s bakterijskom membranom, što ih razlikuje od konvencionalnih antibiotika koji ciljano inhibiraju specifične biokemijske procese u bakterijskoj stanici. Djelovanje QACs spojeva može se klasificirati kao membranolitičko, pri čemu dolazi do destabilizacije lipidnog dvosloja, povećanja permeabilnosti i posljedične lize stanice. Ova nespecifičnost djelovanja pridonosi širokom spektru antimikrobne aktivnosti, ali istovremeno zahtijeva detaljnu procjenu citotoksičnosti i selektivnosti djelovanja kako bi se osigurala njihova potencijalna klinička primjena.

3.3.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Biološka aktivnost sintetiziranih mono- i biskvaternih amonijevih spojeva 3-supstituiranog kinuklidina ispitana je na sojevima Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA (klinički izolat), *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) te na sojevima Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* (izolat iz hrane) i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), pribavljenih iz kolekcije BioGnost.

Ispitivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) provedeno je mikrodilucijskom metodom razrjeđenja prema smjernicama dokumenta *Metode razrjeđenja za ispitivanje osjetljivosti bakterija koje rastu u prisutnosti kisika na antimikrobne tvari* (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically*), u izdanju Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).¹³⁵

Svježe pripremljen Mueller-Hinton medij (Biolife, Graz, Austrija) inokuliran je odgovarajućim bakterijskim sojem i inkubiran preko noći na 35 °C ili 37 °C pri 220 rpm/min. Sljedećeg dana, kultura je razrijeđena u svježem mediju te dodatno inkubirana pod istim uvjetima do postizanja eksponencijalne faze rasta ($OD_{600}=0,3-0,5$). Na temelju aktualne vrijednosti OD_{600} , prethodno kalibrirane u odnosu na koncentraciju kolonija koje formiraju jedinice (CFU/mL), kultura je razrijeđena do konačne koncentracije od $5 \cdot 10^5$ CFU/mL. Ova suspenzija dodana je u jažice 96-mikrotitarske ploče koje su sadržavale seriju dvostrukih razrjeđenja spojeva, pri čemu je u svaku jažicu dodano 50 μ L suspenzije bakterijske kulture. Mikrotitarske ploče inkubirane su preko noći na 35 °C ili 37 °C, ovisno o korištenom

bakterijskom soju. Vizualna potvrda rezultata provedena je dodatkom 20 μL reagensa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolijev klorid ($\gamma(\text{INT})=6 \text{ mg/mL}$), koji prelazi u ljubičastu boju u prisustvu živih bakterijskih stanica, čime se omogućuje jednostavna detekcija rasta.

3.3.2. Određivanje kinetike inhibicije bakterijskog rasta

Eksperiment određivanja kinetike inhibicije bakterijskog rasta proveden je na dvjema Gram-pozitivnim bakterijama prema kojima je uočena najbolja aktivnost potentnih kandidata mono- i biskvaternih amonijevih spojeva – *S. aureus* ATCC 25923 i *L. monocytogenes* ATCC 7644. Prekonoćna kultura odgovarajućeg bakterijskog soja razrijedi se deset puta u svježem temperiranom Mueller-Hinton (MH) mediju te inkubira u tresilici pri temperaturi od 37 °C uz konstantnu vrtnju od 220 rpm/min. Nakon što kultura dosegne predeskonencijalnu fazu rasta ($\text{OD}_{600}=0,3\text{--}0,5$), razrijedi se do konačne koncentracije stanica $5 \cdot 10^4 \text{ CFU/mL}$. U jažice mikrotitarske ploče, koje sadrže alikvote (50 μL) prethodno pripremljenih kandidata bisQACs u koncentracijama $\frac{1}{2}$ MIK i MIK, otpipetirano je 50 μL razrijeđene bakterijske kulture. Gustoća bakterijske suspenzije praćena je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm (OD_{600}) tijekom 24 sata na fluorometru Tecan Infinite 200 PRO, s intervalima mjerenja svakih 15 minuta. Netretirane bakterijske stanice služe kao pozitivna kontrola koja ukazuje na neometani rast stanica. Rezultati u vidu bakterijskih krivulja rasta prikazani su u ovisnosti o vremenu.

3.3.3. Određivanje potencijala razvoja bakterijske rezistencije

Potencijal za razvoj bakterijske rezistencije ispitan je određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) u prisutnosti protonofora i inhibitora sinteze ATP-a, karbonil cijanida 3-klorfenilhidrazona (CCCP). Bakterijski soj korišten u ovom eksperimentu, *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA), posjeduje gene odgovorne za ekspresiju efluks pumpi. Minimalna inhibitorna koncentracija CCCP-a na spomenutu bakteriju utvrđena je prije izvođenja eksperimenta s kandidatima spojeva. Prekonoćna kultura *S. aureus* ATCC 33591 razrijedi se u svježem temperiranom Mueller-Hinton (MH) mediju i kultivira u orbitalnoj tresilici pri 37 °C i 220 rpm/min. Spojevi su serijski razrijeđeni u mikrotitarskoj pločici u 50 μL Mueller-Hinton (MH) medija uz dodatak 10 μM CCCP-a. Raspon početnih koncentracija spojeva iznosio je od 250

do 75 μM , ovisno o ispitivanoj skupini spojeva. Kada je kultura dosegla predeksponencijalnu fazu rasta ($\text{OD}_{600}=0,3-0,5$), razrijedi se do konačne koncentracije stanica koja odgovara $5 \cdot 10^5$ CFU/mL u MH mediju s dodatkom 10 μM CCCP-a. Ukupno 50 μL pripremljene stanične suspenzije otpipetira se u jažice mikrotitarske pločice koja sadrži odgovarajuću koncentraciju ispitivanih spojeva (75-250 μM). Mikrotitarska pločica se inkubira preko noći te se nakon 24 sata inkubacije vizualno odredi MIK. Ukoliko su testirani spojevi supstrati efluks pumpi, u prisustvu CCCP-a kao inhibitora sinteze ATP-a, MIK testiranih spojeva će se smanjiti.

3.3.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije bakterijskih biofilmova

Prekonoćna kultura odgovarajuće bakterije razrijeđena je 10 puta u svježem, temperiranom Mueller-Hinton (MH) mediju, nakon čega je inkubirana u tresilici pri 37 °C uz konstantnu vrtnju od 220 rpm/min. Kada kultura dosegne predeksponencijalnu fazu rasta ($\text{OD}_{600}=0,3-0,5$), razrijedi se do koncentracije stanica $4 \cdot 10^6$ CFU/mL. 50 μL ovako pripremljene kulture otpipetira se u mikrotitarsku pločicu koja sadrži odgovarajuće spojeve u različitim koncentracijama (100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ te 12,5 $\mu\text{g/mL}$). Mikrotitarska pločica se potom inkubira 24 sata (ovisno o ispitivanom bakterijskom soju i do 48 sati). Nakon inkubacije kulture s antimikrobnim agensima, hranjivi medij se aspirira iz jažice, pazeći pritom na eventualno formirani biofilm. Jažice se isperu 2 puta MQ vodom, koja se nakon ispiranja također aspirira. U svrhu fiksiranja formiranog biofilma, mikrotitarska pločica se suši u inkubatoru jedan sat pri 60 °C. Nakon sušenja i fiksacije biofilma, u jažice se doda 100 μL 0,1%-tne otopine kristal violeta nakon čega slijedi inkubacija jedan sat na sobnoj temperaturi. Nevezana boja ukloni se jednim ispiranjem s MQ vodom i pločica se neko vrijeme ostavi na sušenju. Nakon bojenja formiranog biofilma kristal violetom i uklanjanja viška boje, u svaku jažicu mikrotitarske pločice dodano je 100 μL 70%-tnog etanola radi otapanja kristal violeta vezanog za biofilm. Pločica je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. U slučajevima kada boja nije bila potpuno otopljenja tijekom inkubacije, preostali talog resuspendiran je pažljivim pipetiranjem pomoću multikanalne pipete kako bi se osigurala potpuna ekstrakcija boje. Iz svake jažice otpipetirano je 100 μL dobivene otopine u novu mikrotitarsku pločicu, nakon čega je izmjeren intenzitet apsorbancije pri 595 nm pomoću optičkog čitača (Tecan Infinite 200

PRO). Intenzitet apsorbancije proporcionalan je količini formiranog biofilma. Kao pozitivna kontrola korištene su netretirane stanice, dok je negativna kontrola bio Mueller-Hinton medij.

3.3.5. Određivanje viabilnosti stanica u vremenu klasičnom metodom nasijavanja i prebrojavanja tretiranih stanica

Eksperiment određivanja viabilnosti stanica u vremenu proveden je na reprezentativnoj Gram-pozitivnoj bakteriji, *S. aureus* ATCC 25923. Prekonoćna kultura razrijedi se u svježem temperiranom Mueller-Hintor (MH) mediju te ostavi u inkubatorskoj tresilici na temperaturi od 37 °C uz konstantnu vrtnju pri 220 rpm/min. Nakon što kultura dosegne predeskonencijalnu fazu rasta ($OD_{600}=0,3-0,5$), razrijedi se do konačne koncentracije stanica $5 \cdot 10^5$ CFU/mL. Volumen od 50 μ L razrijeđene bakterijske kulture otpipetiran je u jažice mikrotitarske pločice koje su sadržavale 50 μ L ispitivanih spojeva u koncentracijama $\frac{1}{2}$ MIK, MIK i $2 \times$ MIK. Netretirane stanice služe kao kontrola rasta, a čisti MH medij predstavlja negativnu kontrolu i potvrđuje odsutnost kontaminacije. Prije nego što se mikrotitarska pločica stavi na inkubaciju pri 37 °C, iz svake jažice otpipetira se alikvot od 10 μ L i razrijedi u 990 μ L MH medija. Pripravljeno razrjeđenje bakterijske kulture dalje se serijski razrjeđuje do 10^6 x. Potom se 20 μ L odgovarajućeg razrjeđenja sterilnom ezom nasije u duplikatima na krute MH podloge, kako bi se idući dan prebrojavanjem kolonija koje su formirane na podlogama nakon inkubacije mogao odrediti ukupan broj stanica na početku eksperimenta. Mikrotitarska pločica se inkubira, a u izabranim vremenskim intervalima se ponavlja prethodno opisani postupak razrjeđivanja i nasijavanja alikvota na krute MH podloge. Nakon inkubacije krutih podloga u trajanju od 24 sata, prebroje se kolonije bakterija te se računa broj viabilnih stanica (CFU/mL) u svakom vremenskom intervalu pri koncentracijama spojeva od $\frac{1}{2}$ MIK, MIK i $2 \times$ MIK, kao i koncentracija netretiranih stanica. Rezultati se prikazuju grafički kao ovisnost $\log_{10}$ CFU/mL o vremenu.

3.4. Mehanizam djelovanja

3.4.1. Test propusnosti membrane prema propidijevom jodidu (PI-uptake assay)

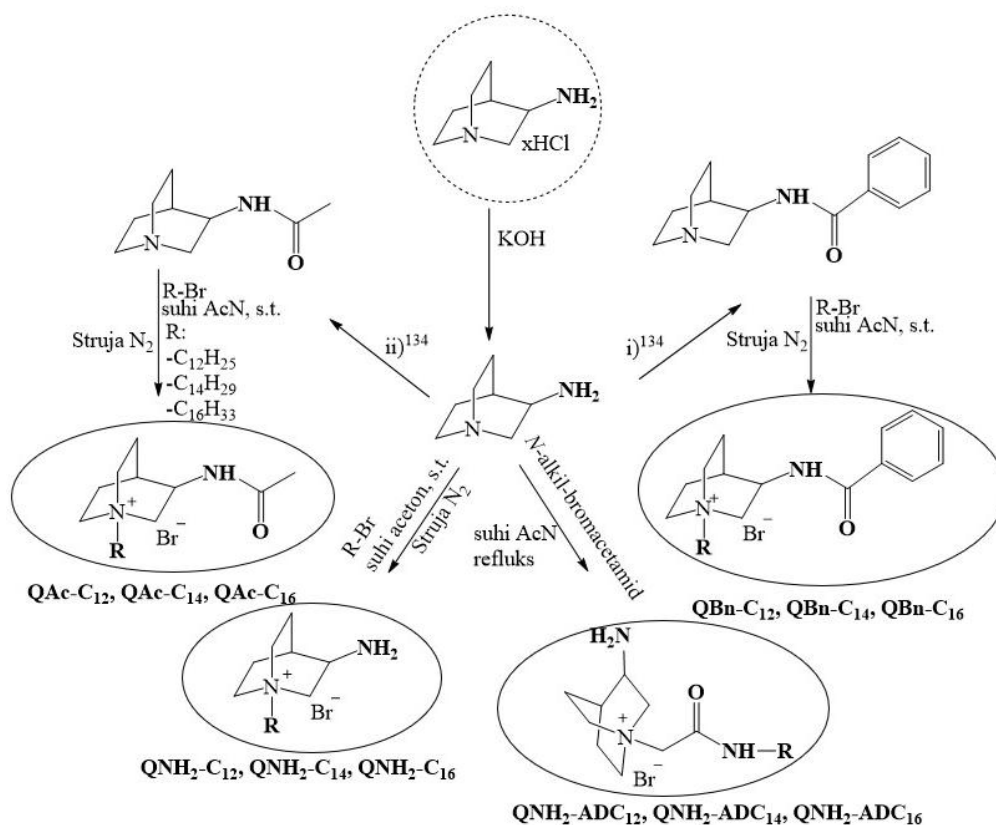
Za procjenu membranolitičkog potencijala, odnosno mehanizma djelovanja, koristila se fluorescentna boja propidijev jodid (PI). PI se veže za molekulu DNA, ali tek uslijed oštećenja

membrane budući da je intaktna membrana nepropusna prema ovoj boji. Intenzitet fluorescencije prati se spektrofluorimetrijski koristeći Gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus* ATCC 25923 u tretmanu i bez tretmana antimikrobnim reagensom. Bakterijska kultura uzgoji se preko noći u Mueller-Hinton (MH) mediju na 37 °C i 160 rpm/min. Sljedećeg dana, kultura se razrijedi u svježem MH mediju dvadeset puta i ostavi pod istim uvjetima rasta do eksponencijalne faze ($OD_{600}=0,3-0,5$). Stanice se zatim centrifugiraju na 4500 x g tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a bakterijski talog razrijedi se u PBS puferu do $OD_{600} = 1,5$. Fluorescencija PI prati se u mikrotitarskim pločicama (Porvair), pri čemu svaka jažica sadrži 100 µL bakterijskih stanica i 100 µL spoja (4 × MIK , 2 × MIK , MIK) koji su prethodno razrijeđeni u otopini PI koncentracije 42 nM. Fluorescencija PI snima se tijekom 540 minuta, na 37 °C, u fluorometru Tecan Infinite 200 PRO koristeći ekscitaciju na 536 nm i emisiju na 617 nm. Pozadinsku fluorescenciju PI oduzme se od svakog mjerenja, a eksperimentalni podaci analiziraju se pomoću Microsoft Excel programa.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Sinteza mono- i biskvaternih amonijevih spojeva

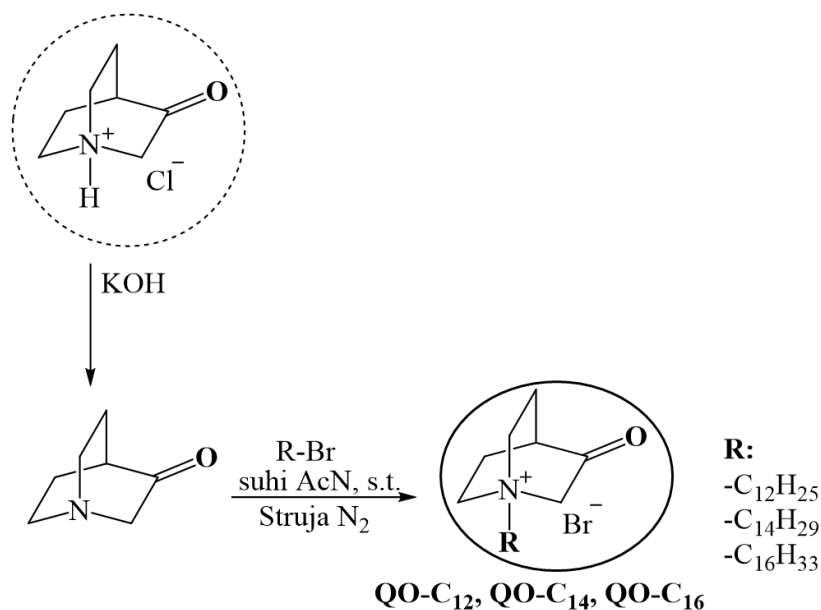
Na slici 27 prikazana je reakcijska shema sinteze novih, monoQACs ($\pm$)-3-aminokinuklidina odnosno derivata ($\pm$)-3-amidokinuklidina. Spojevi su dobiveni kvaternizacijom ($\pm$)-3-aminokinuklidina i derivata ($\pm$)-3-amidokinuklidina s alkil halogenidima (C_{12} , C_{14} i C_{16}) te kvaternizacijom ($\pm$)-3-aminokinuklidina s *N*-alkil-bromacetamidima (ADC_{12} , ADC_{14} , ADC_{16}). Dobiveni spojevi se razlikuju prema duljini alkilnog lanca i vrsti supstituenta na trećem ugljikovom atomu kinuklidinijevog prstena. Strukturne varijacije mogu utjecati na fizikalno-kemijska i biološka svojstva spojeva. Produkti su izolirani kao bijeli prah.



Slika 27. Shema sinteze novih monoQACs ($\pm$)-3-aminokinuklidina i njegovih derivata.

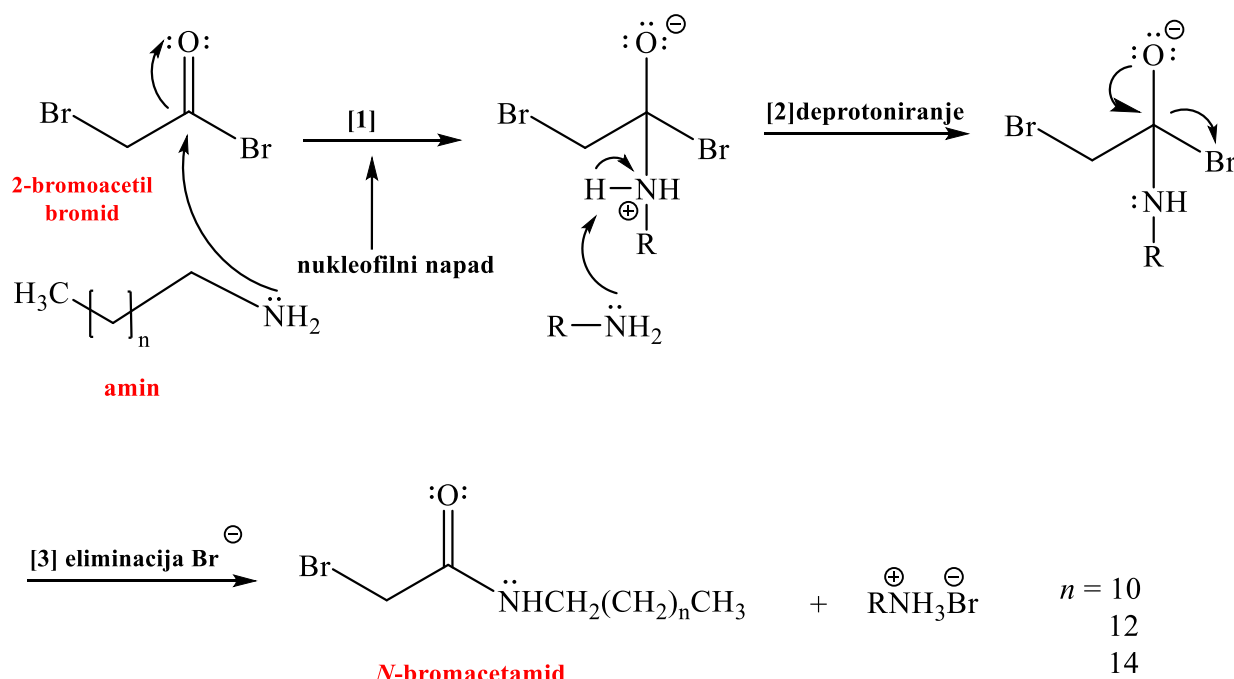
U svrhu ispitivanja utjecaja polarosti supstituenta na trećem ugljikovom atomu kinuklidinijevog prstena, sintetizirana je serija monoQACs kinuklidin-3-ona. Shema sinteze prikazana je na slici

28. Spojevi su dobiveni kvaternizacijom kinuklidin-3-ona s alkilnim halogenidima različite duljine ugljikovodičnog lanca (C_{12} , C_{14} i C_{16}).



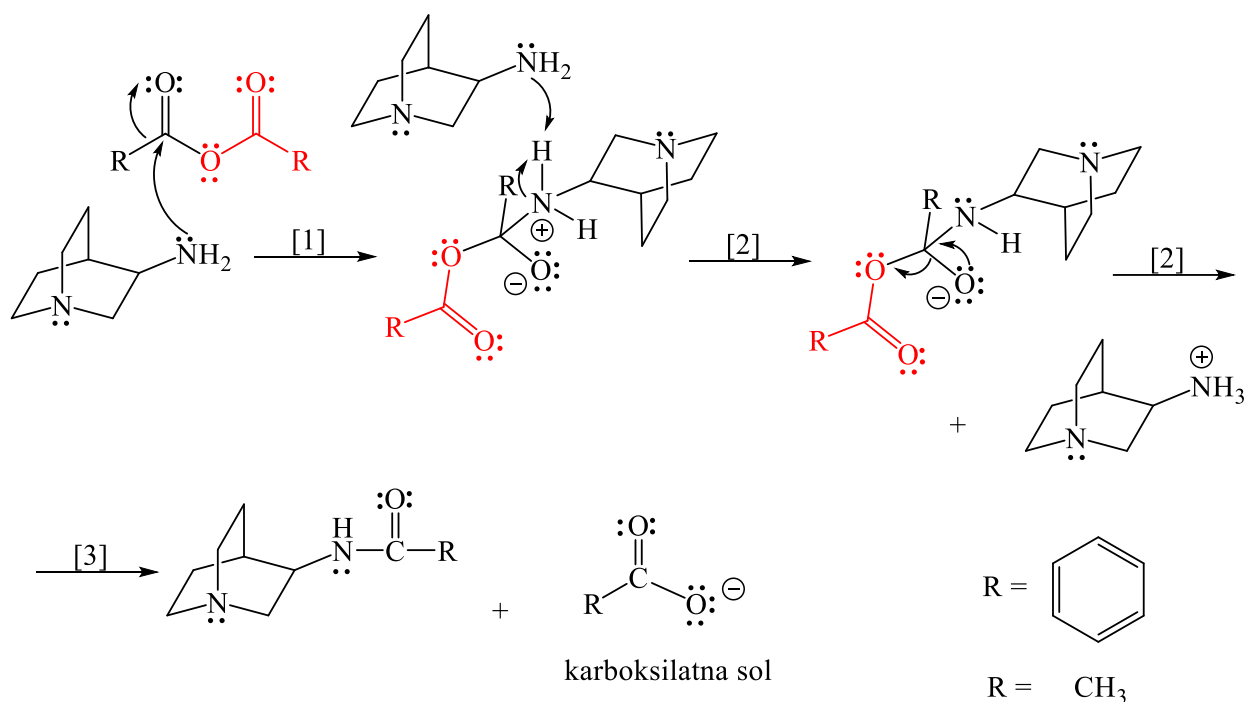
Slika 28. Shema sinteze novih monoQACs kinuklidin-3-ona.

Na slici 29, prikazan je mehanizam sinteze tri prekursora *N*-alkil-2-bromacetamida koji se koja su korištena u reakcijama kvaternizacije s 3-aminokinuklidinom, a koji se razlikuju po duljini alifatskog lanca. Mehanizam se odvija putem nukleofilne acilne supstitucije. Reakcija se odvija tako da amin kao nukleofil napada elektrofilni karbonilni ugljik 2-bromacetil bromida, formirajući nestabilni tetraedarski međuprodukt koji uz eliminaciju bromidnog iona (Br^-), rezultira nastankom odgovarajućeg sekundarnog amida. Nusprodukt HBr može se neutralizirati dodatkom baze poput trietilamina. Reakcija se provodi u bezvodnim uvjetima, najčešće u diklorometanu pri kontroliranoj temperaturi ($0-5\text{ }^{\circ}C$) kako bi se smanjila mogućnost nusreakcija poput daljnje alkilacije ili eliminacije. Produkti su dobiveni kao bijeli prah.



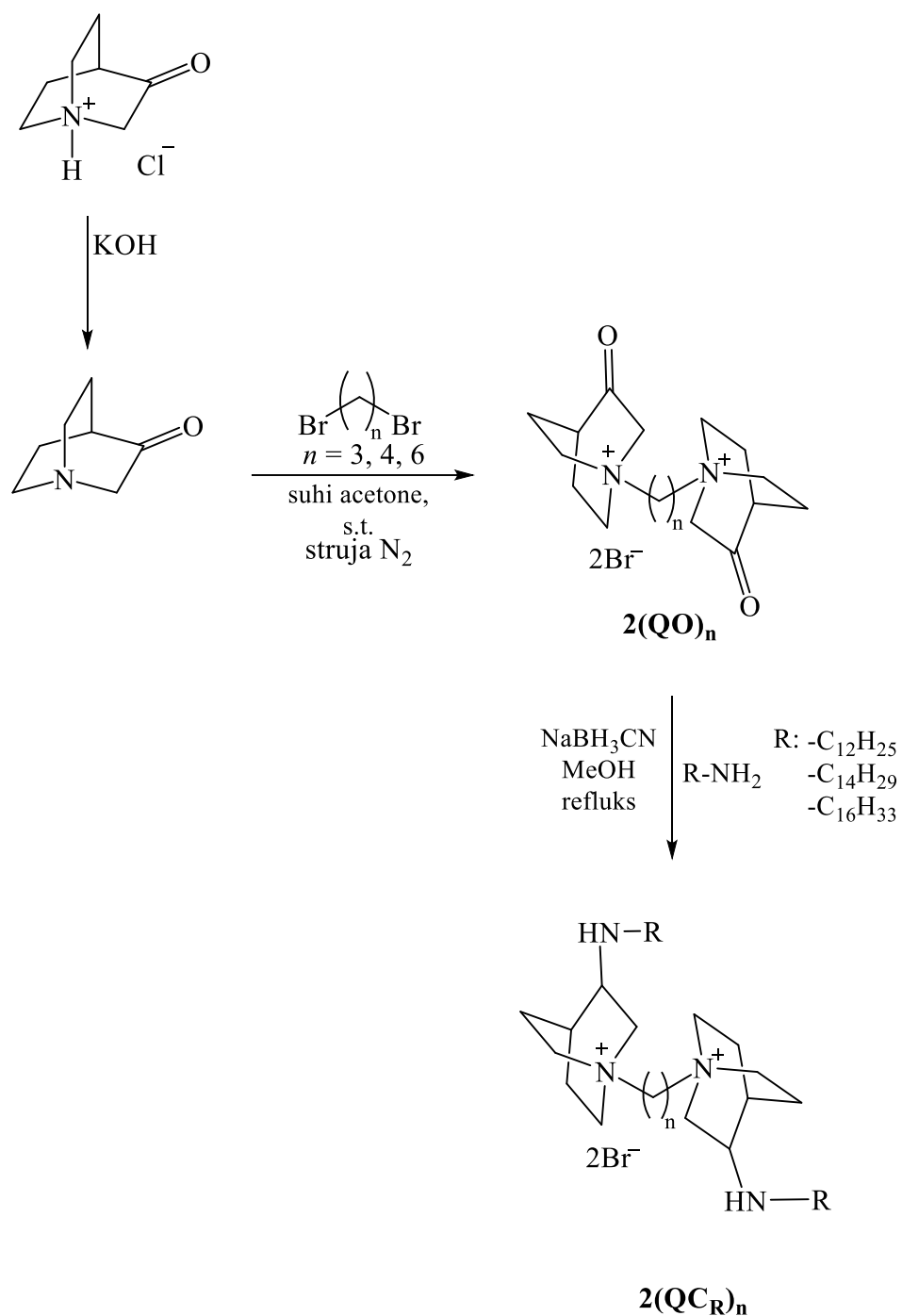
Slika 29. Shema reakcijskog mehanizam sinteze prekursora *N*-alkil-2-bromoacetamidima s različitom duljinom alkilnog lanca.

Također, mehanizam formiranja početnih prekursora 3-amidokinuklidina se odvija po mehanizmu nukleofilne acilne supstitucije, slika 30. Iako su nešto manje reaktivni od kiselinskih klorida, anhidridi ipak lako reagiraju s većinom nukleofila stvarajući supstitucijske produkte. Reakcije nukleofilne supstitucije anhidrida ne razlikuju se od reakcija ostalih funkcionalnih derivata karboksilnih kiselina, iako anhidridi sadrže dvije karbonilne skupine. Nukleofilni napad događa se na jednoj karbonilnoj skupini, dok druga karbonilna skupina postaje dio odlazeće skupine. Osim uobičajenih koraka nukleofilne adicije i eliminacije odlazeće skupine, potreban je dodatni prijenos protona. Mehanizam uključuje tri koraka. Nukleofil (amin) napada elektrofilni C karbonilne skupine, stvarajući sp^3 hibridizirani ugljik. Gubitkom protona i eliminacijom odlazeće skupine (RCO_2^-) tvori se supstitucijski produkt, 2°amid.



Slika 30. Shema reakcijskog mehanizma nukleofilne acilne supstitucije nastajanja 3-amidokinuklidina.

Na slici 31, prikazana je reakcijska shema sinteze novih biskvaternih amonijevih spojeva kinuklidin-3-ona, sintetiziranih reakcijama kvaternizacije s alkil-dihalogenidima različitih duljina (3, 4 i 6 C atoma). Također, prikazana je i sinteza biskvaternih amonijevih soli koje sadrže dugolančane alkilne skupine (12, 14 i 16 C atoma) na trećem ugljikovom atomu molekule kinuklidina. Produkti su dobiveni kao bijeli prah.

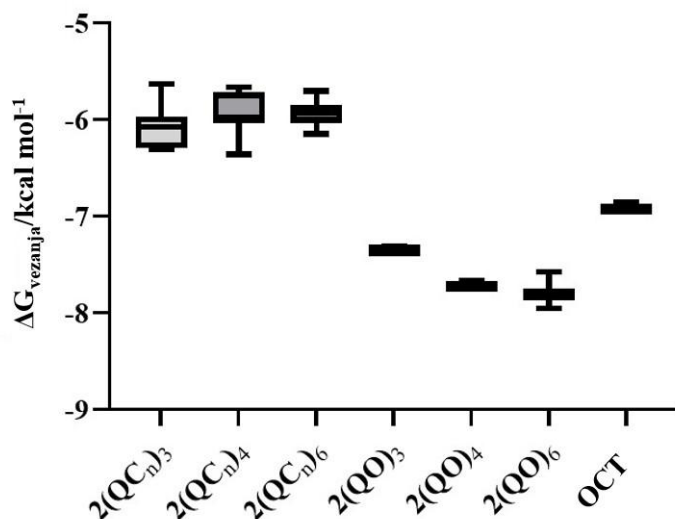


Slika 31. Shematski prikaz sinteze novih biskvaternih amonijevih spojeva 3-supstituiranog kinuklidina.

4.2. Evaluacija amfifilnih i farmakokinetičkih svojstava spojeva

4.2.1. *In silico* analiza vezanja bisQACs na regulatorni protein QacR

Ekspresiju efluksnih sustava usmjerenih na kvaterne amonijeve spojeve (QACs) u višestruko rezistentnih bakterija regulira transkripcijski represor QacR, ključni modulator genske ekspresije efluks pumpi.¹⁵⁷ Vezanjem malih molekula efektor, poput QACs, QacR prolazi konformacijske promjene koje uklanjaju represiju te aktiviraju transkripciju gena uključenih u efluks, čime se pospešuje razvoj antimikrobne rezistencije.¹⁵⁸ Wuest i suradnici pokazali su da višestruka kvaternizacija heterocikličkih okosnica smanjuje njihovu sposobnost interakcije s QacR proteinom, što dovodi do slabijeg induciranja efluks mehanizama.¹⁵² U skladu s tim rezultatima, naši podaci pokazuju da biskvaterne amonijeve soli (bisQACs) pokazuju znatno slabiji afinitet vezanja prema QacR proteinu u usporedbi s komercijalnim bisQAC spojem, oktenidin dihidrokloridom (OCT), što je potvrđeno višim izračunatim slobodnim energijama vezanja ($\Delta G_{\text{vezanja}}$). Smanjena interakcija s QacR proteinom ukazuje na smanjen potencijal za induciranje ekspresije efluks pumpi.¹⁵⁹ Stoga se bisQACs izdvajaju kao obećavajući antimikrobni kandidati s reduciranim rizikom razvoja rezistencije. Dobiveni nalazi pružaju mehanističku osnovu za racionalni dizajn antimikrobnih sredstava nove generacije temeljenih na QACs, koja zadržavaju učinkovitost uz istodobno ograničeno induciranje rezistencije putem transkripcijske regulacije.



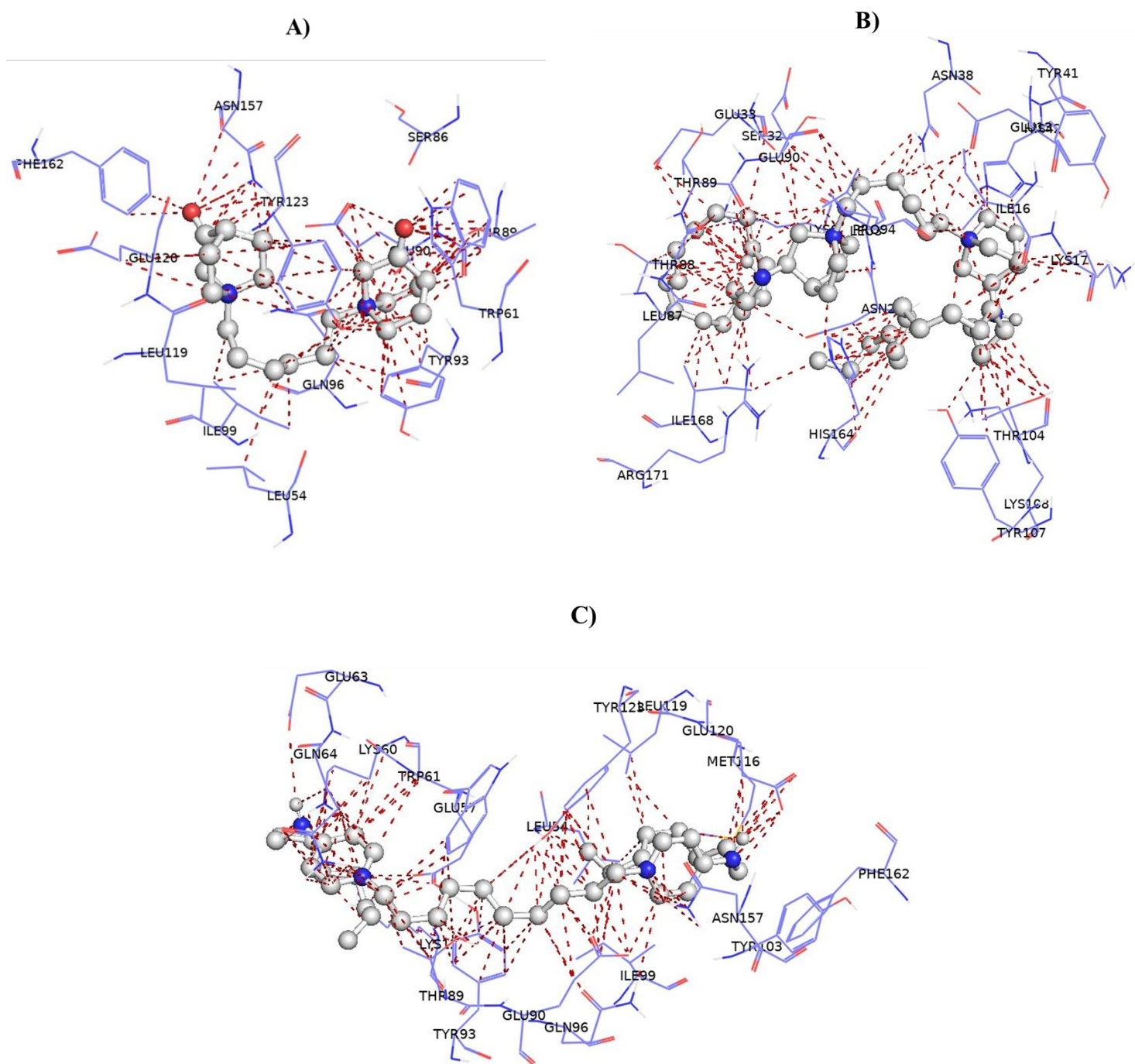
Slika 32. Box-and-Whisker dijagram izračunatih $\Delta G_{\text{vezanja}}$ vrijednosti za bisQAC analoge ($n = 12\text{C}, 14\text{C}$ i 16C) u interakciji s QacR proteinom.

Modifikacije u duljini alkilnog lanca i duljini poveznica značajno utječu na afinitet vezanja kvaternih amonijevih spojeva (QACs) prema transkripcijskom regulatornom proteinu QacR. Općenito, spojevi s duljim alkilnim lancima (npr. C₁₆) pokazuju znatno slabiji afinitet vezanja u usporedbi s njihovim analogima kraćeg lanca (npr. C₁₂), a taj je trend osobito izražen kod molekula s najkraćim povezačem ($n = 3$). Budući da jače vezanje za QacR dovodi do derepresije gena za efluks pumpe, smanjena interakcija ovih bisQAC derivata dugih lanaca s QacR-om može se smatrati povoljnom značajkom za sprječavanje aktivacije mehanizama bakterijske rezistencije.

Naši rezultati dodatno upućuju na to da zamjena hidrofobnog alkilnog lanca fragmentom koji sadrži karbonilnu skupinu značajno povećava afinitet spojeva prema QacR-u, što podupire hipotezu da polarniji supstituenti pojačavaju interakcije s regulatornim domenama proteina. Daljnja eksperimentalna ispitivanja, usmjerena na validaciju ovih rezultata, trebala bi pružiti napredniji uvid u strukturno-vezne odnose spojeva prema regulatoru efluksa.

Oktenidin dihidroklorid (OCT), komercijalno dostupni antiseptik, pokazuje srednji afinitet vezanja prema QacR-u. Njegov je afinitet znatno viši od novonastalih 2(QC_n) biskvaternih amonijevih spojeva (bisQACs), ali ipak niži od afiniteta biskvaternih amonijevih spojeva soli izvedenih iz kinuklidin-3-ona, 2(QO)_n, koje ostvaruju snažnije interakcije.

S obzirom na ulogu QacR-a kao transkripcijskog represora efluks sustava, ligandi visokog afiniteta mogu potaknuti derepresiju gena, olakšavajući brzi efluks antimikrobnih sredstava te potencijalno ugrožavajući njihovu unutarstaničnu stabilnost i baktericidnu učinkovitost. Nasuprot tome, spojevi poput 2(QC_n), koji pokazuju slabije vezanje za QacR, mogli bi izbjeći aktiviranje efluks mehanizama te na taj način zadržati produljenu unutarstaničnu aktivnost. Ova ih značajka čini privlačnim kandidatima za daljnji razvoj antimikrobnih sredstava sa smanjenom sklonošću induciranju bakterijske rezistencije.



Slika 33. Molekulska simulacija proteina QacR u kompleksu s bisQAC spojevima unutar hidrofobnog veznog džepa: A) 2(QO)₆, B) 2(QC₁₆)₆ i C) OCT. Atomi ugljika prikazani su sivom bojom, dušik plavom, a atomi kisika i interakcije crvenom.

Kristalna struktura transkripcijskog represora QacR koji veže različite lijekove (PDB ID: 1JUP) odabrana je jer predstavlja dobro okarakteriziran modelni protein za proučavanje vezanja strukturno raznolikih kationskih i hidrofobnih liganada. S obzirom na to da bisQACs dijele kemijske značajke sa supstratima za koje je poznato da ostvaruju interakcije s QacR-om, ovaj protein pruža relevantan strukturni okvir za racionalizaciju opažene biološke aktivnosti.

Hidrofobni vezni džep QacR-a pokazuje izraženu strukturnu plastičnost, što omogućuje prepoznavanje i smještaj strukturno raznolikih kvaternih amonijevih spojeva (QACs), uključujući i bisQACs, slika 33. Ta prilagodljivost proizlazi iz konformacijske fleksibilnosti bočnih lanaca ključnih aminokiselinskih ostataka te inducibilne prirode mjesta vezanja više lijekova.^{160,161}

Vezanje bisQACs prvenstveno je vođeno kombinacijom nekovalentnih interakcija, uključujući elektrostatske interakcije između kvaternih dušikovih atoma i kiselih ostataka (npr. Asp, Glu), hidrofobne kontakte između dugih alkilnih lanaca i nepolarnih ostataka (npr. Leu, Val, Phe), kao i potencijalne π -kationske interakcije s aromatskim ostacima poput Tyr ili Phe.¹⁶² Dodatne van der Waalsove sile dodatno stabiliziraju ligand unutar veznog mjesta.¹⁶³

Ova kombinacija interakcija temelj je široke supstratne specifičnosti QacR-a te njegove sposobnosti da reagira na čitav spektar kationskih antimikrobnih sredstava aktivacijom transkripcije gena za efluks pumpe.

4.2.2. Kritična micelarna koncentracija

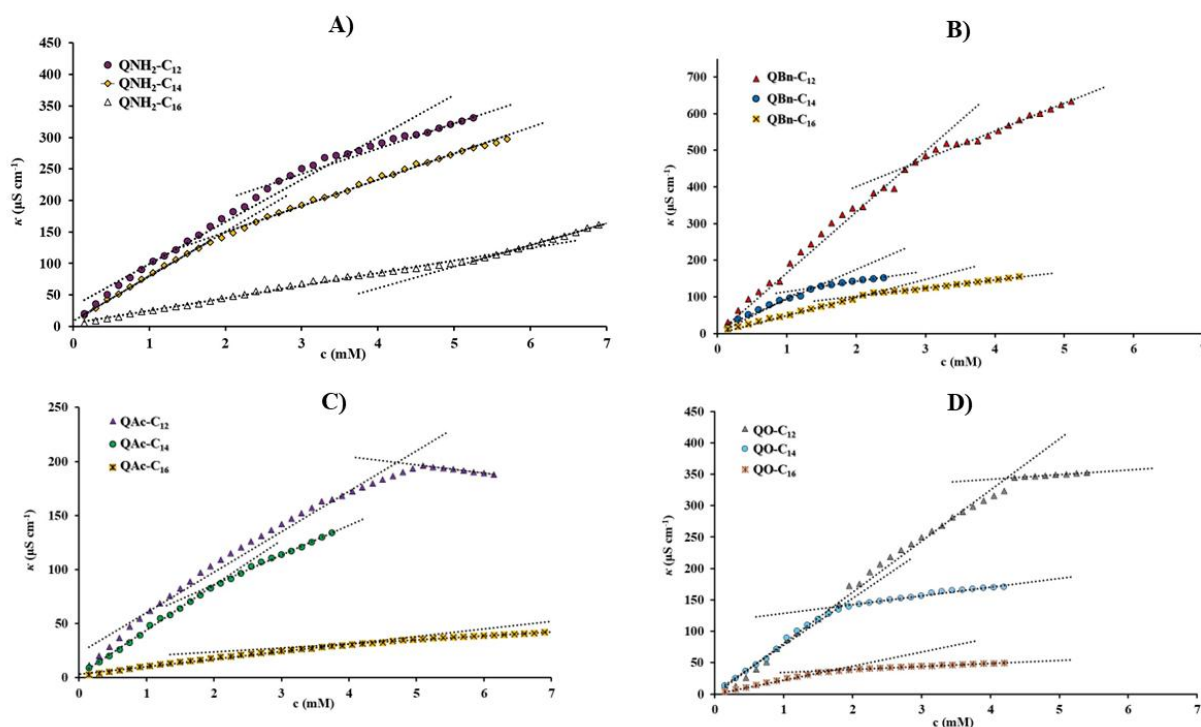
Konduktometrija je iznimno osjetljiva i precizna fizikalno-kemijska metoda koja se široko primjenjuje u proučavanju međuionskih interakcija u otopinama, osobito u sustavima gdje dolazi do strukturnih transformacija poput stvaranja ionskih parova, kompleksa ili agregacije ionskih vrsta. Zahvaljujući mogućnosti praćenja promjena u ionskoj pokretljivosti i broju nositelja naboja u otopini, konduktometrijska mjerenja pružaju vrijedan uvid u ponašanje elektrolita na molekularnoj razini te omogućuju kvantitativnu analizu procesa kao što su micelizacija i formiranje supramolekulskih struktura.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶

U ovom istraživanju provedena su konduktometrijska mjerenja specifične vodljivosti (κ) u funkciji koncentracije (c) za niz sintetiziranih monokvaternih amonijevih soli. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 34, a analiza grafičkih podataka omogućila je određivanje kritične koncentracije

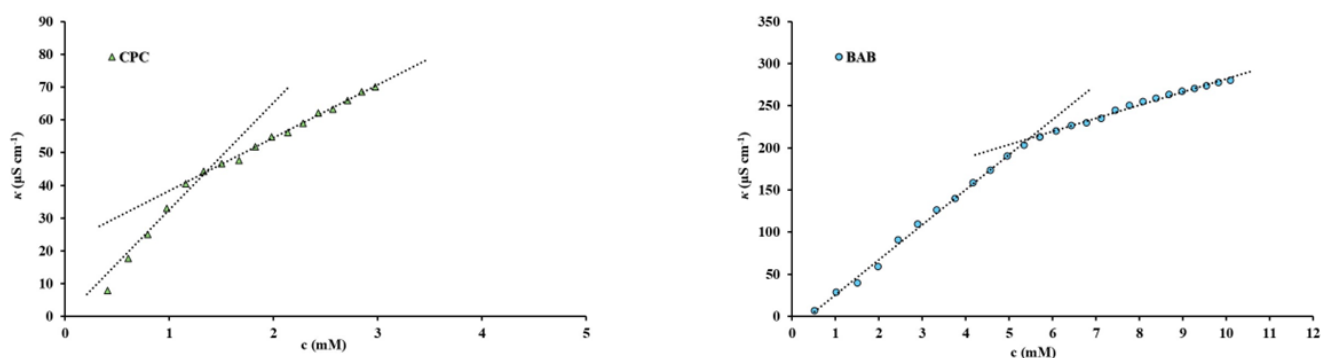
micelizacije (cmc). Naime, uočena su dva linearna područja na krivulji $\kappa = f(c)$, koja odgovaraju različitim režimima u sustavu — premicelarnom, gdje su prisutni isključivo monomerni surfaktanti, i micelarnom, u kojem dolazi do formiranja micela. Prijelaz između ta dva režima karakteriziran je promjenom nagiba, pri čemu je cmc vrijednost definirana kao točka presjeka dvaju pravaca ekstrapoliranih iz tih područja.¹⁶⁷

Pad nagiba nakon postizanja cmc-a rezultat je smanjenja udjela slobodnih monomera u otopini, budući da se dodatni surfaktanti uključuju u micelarne agregate koji posjeduju manju ukupnu pokretljivost iona po molekuli.¹⁶⁸ Nadalje, proces micelizacije doprinosi smanjenju broja slobodnih nositelja naboja po jediničnom volumenu, što se izravno očituje u sporijem porastu specifične vodljivosti s porastom koncentracije.

Provedena konduktometrijska analiza time ne samo da potvrđuje sposobnost sintetiziranih kvaternih amonijevih soli za spontano formiranje micela, već također omogućuje kvantitativno određivanje koncentracijskog praga pri kojem dolazi do takvih agregacijskih procesa, što je ključno za razumijevanje njihova ponašanja u biološkim i farmaceutskim sustavima.



E)



Slika 34. Krivulje vodljivosti (κ) u ovisnosti o koncentraciji monokvaternih amonijevih surfaktanata u vodenj otopini pri 25 °C prikazane su za kvaterne aminijeve spojeve (A) QNH₂, (B) QBn, (C) QAc, (D) QO i (E) komercijane kvaterne amonijeve spojeve benzildimetildodecilamonijev bromid (BAB) i cetilpiridinijev klorid (CPC).

Dobiveni rezultati kritične micelarne koncentracije (cmc) za monokvaterne amonijeve spojeve u skladu su s prethodno objavljenim podacima za kinuklidin-3-ol, što dodatno potvrđuje pouzdanost i konzistentnost ovih rezultata u kontekstu ponašanja surfaktanata u vodenim otopinama.¹⁶⁹

Za kvaterne amonijeve soli 3-aminokinuklidina, kvaternizirane dugim amidnim lacima (ADC₁₂, ADC₁₄ i ADC₁₆) nije bilo moguće odrediti kritičnu micelarnu koncentraciju (cmc) zbog njihove izrazito slabe topljivosti u vodenim otopinama. Tijekom pokušaja otapanja u ispitivanim koncentracijskim rasponima, primijećena je agregacija QACs, što je rezultiralo mliječnim koloidnim zamućenim otopinama, karakterističnim za sustave s velikim udjelom neotopljenih ili koloidno dispergiranih čestica. Ovakvo ponašanje onemogućilo je provedbu konduktometrijske analize te pouzdanu procjenu cmc vrijednosti, budući da fizikalno-kemijska svojstva otopina nisu omogućila dobivanje konzistentnih podataka u okviru primijenjene metode.

Istraživanjem je utvrđeno da svi ispitivani surfaktanti pokazuju karakteristično ponašanje tipično za površinski aktivne tvari, pri čemu su dobivene vrijednosti cmc-a u izravnoj korelaciji s duljinom alkilnog lanca. Ovo opažanje u skladu je s općim pravilnostima u ponašanju surfaktanata, gdje duži alkilni lanci rezultiraju nižim vrijednostima cmc-a zbog povećane hidrofobnosti, koja pogoduje učinkovitijem agregiranju molekula surfaktanta u micelarne strukture. Takvi rezultati također su u skladu s prethodnim istraživanjima u okviru ovog rada, kao i s ranije objavljenim podacima.^{169,170}

Posebno je zanimljivo uočiti izraženu razliku u nagibu konduktometrijske krivulje iznad cmc-a kod spojeva s kraćim ugljikovodičnim lancima, što je prikazano na slici 34. Naime, strmiji nagib kod QACs s kraćim alkilnim lancima sugerira bržu migraciju manjih agregata unutar otopine. Ova pojava može se pripisati manjim dimenzijama i potencijalno nižoj viskoznosti micela koje nastaju u prisustvu kraćih lanaca, čime se olakšava brži porast vodljivosti s povećanjem koncentracije iznad cmc-a. Dobiveni rezultati u skladu su s nalazima Quagliotta i suradnika te Zhaoa i suradnika što dodatno potkrepljuje hipotezu prema kojoj surfaktanti s kraćim alkilnim lancima formiraju kompaktnije agregate s povećanom mobilnošću u vodenim medijima.^{166,170}

Ovakvo ponašanje ima potencijalne implikacije za dizajn i primjenu kvaternih amonijevih spojeva, osobito u formulacijama gdje je poželjna brza reakcija sustava ili povećana vodljivost, kao što su elektrolitske otopine, antimikrobna sredstva te aplikacije u sustavima prijenosa naboja. Nadalje, spoznaje o utjecaju duljine alkilnog lanca na sposobnost agregacije mogu se iskoristiti za optimizaciju performansi QACs različitim industrijskim, farmaceutskim i okolišnim primjenama, gdje se specifična svojstva micelnog sustava mogu dizajnirati prema zahtjevima konkretne aplikacije.

Struktura molekule surfaktanta, osobito priroda i svojstva polarne glave te vrsta funkcionalnih skupina prisutnih unutar molekule, ima ključnu ulogu u procesu micelizacije i određivanju kritične micelarne koncentracije (cmc). U tom kontekstu, prisutnost polarnih supstituenata, poput amidne veze (–CONH–), može značajno utjecati na termodinamičke parametre agregacije i međumolekularne interakcije koje pogoduju ili otežavaju formiranje micela. Amidna veza je visoko polarna funkcionalna skupina, sposobna uspostavljati vodikove veze kako unutar molekule (intramolekulski), tako i s molekulama otapala (intermolekulski), čime dodatno doprinosi kompleksnosti ponašanja surfaktanata u vodenim sustavima.^{171,172}

Povećana hidrofilnost kao posljedica prisutnosti amidne veze može rezultirati smanjenom tendencijom molekula za agregaciju u micelarne strukture, budući da je energijski manje povoljno izložiti hidrofobne dijelove otapalu. Posljedično, prisutnost amidne veze može dovesti do porasta vrijednosti cmc-a, jer je potrebna veća koncentracija surfaktanta kako bi se nadvladale interakcije s otapalom i potaknula micelizacija, što opažamo kod spojeva QAc-C₁₂ i QAc-C₁₄, slika 34 (C).

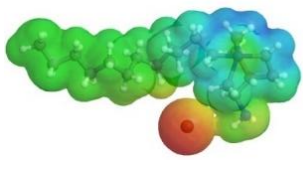
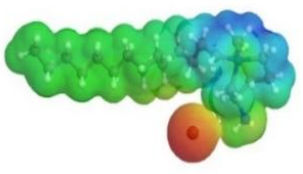
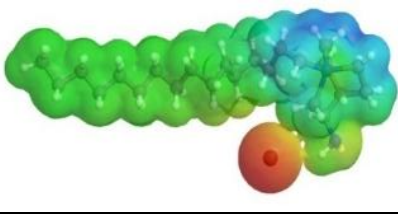
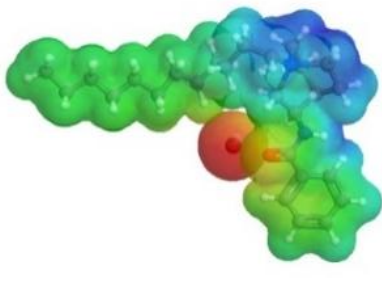
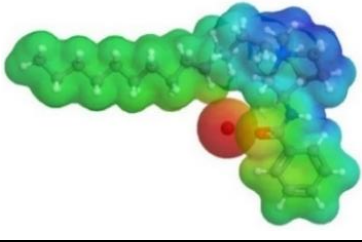
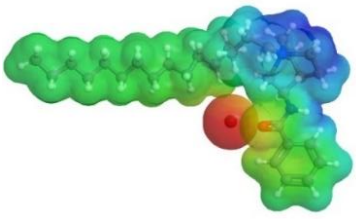
S druge strane, u određenim sustavima amidna veza može djelovati kao „poveznica“ između hidrofilnog i hidrofobnog segmenta molekule, omogućujući veću fleksibilnost u orijentaciji molekula tijekom formiranja agregata. Uz to, vodikove veze uspostavljene između amidnih

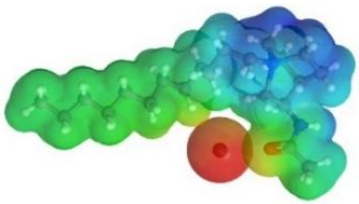
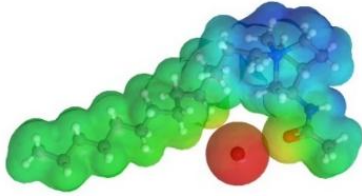
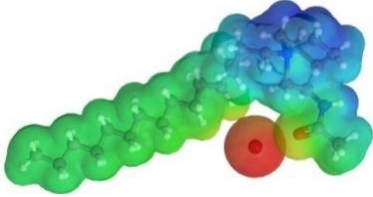
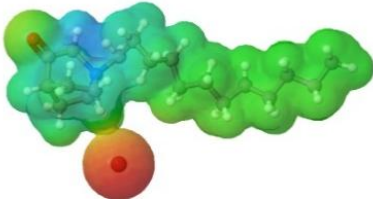
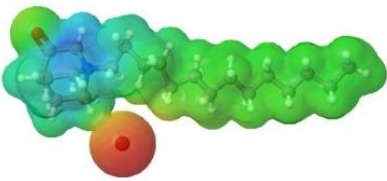
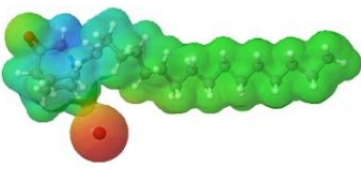
skupina različitih molekula mogu pridonijeti dodatnoj stabilizaciji micelarne jezgre, što u određenim slučajevima može kompenzirati povećanu hidrofilnost i rezultirati smanjenjem cmc-a.

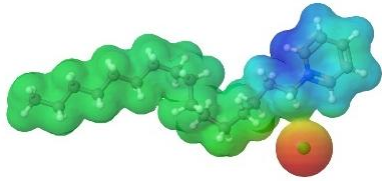
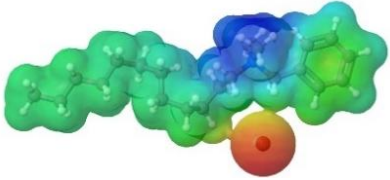
Dakle, utjecaj amidne veze na micelizaciju ovisi o ravnoteži između ovih suprotnih efekata: s jedne strane, povećana hidrofilnost može odgoditi agregaciju i povišiti cmc, dok s druge strane, mogućnost međumolekularne stabilizacije putem vodikovih veza može pogodovati formiranju micela i time sniziti cmc.

Empirijski, uočeno je da prisutnost amidne veze u strukturi kvaternih amonijevih spojeva često dovodi do blagog povećanja cmc-a u usporedbi s analognim molekulama bez takve funkcionalne skupine, što upućuje na prevladavanje hidrofilnog efekta.¹⁷³ Ovakvi rezultati posebno su važni pri dizajnu novih površinski aktivnih tvari za specifične primjene, gdje je kontrola nad vrijednostima cmc-a i stabilnošću micelnog sustava ključna, primjerice u sustavima za ciljanu dostavu bioaktivnih molekula ili u formulacijama s kontroliranim otpuštanjem.

Tablica 3. Prikaz dobivenih vrijednosti kritične micelarne koncentracije (cmc) za monokvaternne amonijeve spojeve izvedene iz kinuklidina i referentne standarde, uz pripadajuće strukture modelirane metodom kuglica i štapića.

Kratica spoja	Struktura spoja	cmc (mM)
QNH ₂ -C ₁₂		5,66
QNH ₂ -C ₁₄		3,33
QNH ₂ -C ₁₆		1,97
QBn-C ₁₂		2,84
QBn-C ₁₄		2,18
QBn-C ₁₆		1,38

QAc-C ₁₂		4,72 
QAc-C ₁₄		4,04 
QAc-C ₁₆		2,04 
QO-C ₁₂		4,24 
QO-C ₁₄		1,84 
QO-C ₁₆		1,74 

CPC		1,16 
BAB		5,46 

4.2.3. Molekulski deskriptori

U okviru ovog istraživanja, predikcija hidrofilno-hidrofobnih svojstava svih sintetiziranih spojeva provedena je korištenjem online alata SwissADME (dostupan na www.swissadme.ch, pristupljeno 23. siječnja 2025.), koji omogućuje preciznu procjenu lipofilnosti molekula putem izračuna prosječne vrijednosti *cLogP*. Ova vrijednost dobiva se integracijom više algoritama za predikciju, uključujući *iLogP*, *xLogP*, *wLogP*, *mLogP* čime se osigurava sveobuhvatna i pouzdana procjena lipofilnog karaktera ispitivanih molekula. Povišene vrijednosti *cLogP* ukazuju na izraženiju sklonost spoja particiji u lipidnu fazu, što predstavlja važan pokazatelj njegove distribucije i ponašanja u složenim biološkim sustavima.¹⁷⁴

Dobivene vrijednosti *cLogP* prikazane su u tablici 4. Spojevi iz skupine monokvaternih amonijevih spojeva 3-supstituiranog kinuklidina pokazali su niske *cLogP* vrijednosti u odnosu na biskvaterne amonijeve spojeve što sugerira relativno uravnoteženu distribuciju ovih spojeva između lipofilne (hidrofobne) i hidrofilne faze. Spojevi s nižim *cLogP* vrijednostima karakterizirani su smanjenom lipofilnošću i višim afinitetom prema vodenoj fazi, što može rezultirati ograničenom sposobnošću difuzije kroz biološke membrane. Budući da učinkoviti prolazak kroz lipidni dvosloj stanične membrane zahtijeva hidrofobniji karakter, spojevi s nižim *cLogP* vrijednostima pokazuju smanjenu membransku permeabilnost. Unatoč tomu, navedeno

svojstvo može imati pozitivan učinak na topljivost u vodenim sustavima, što je osobito relevantno u kontekstu formulacije i bioraspoloživosti u farmakološkim primjenama.

Suprotno tome, derivati biskvaternih amonijevih soli karakterizirani su višim vrijednostima $cLogP$, što ukazuje na izraženiju hidrofobnost ovih spojeva. Povećana lipofilnost rezultira većom tendencijom molekula za particiju u lipidnu fazu, uključujući stanične membrane, čime se povećava njihova sposobnost za membransku penetraciju. Spojevi s višim $cLogP$ vrijednostima obično iskazuju bolju bioraspoloživost u sustavima gdje je interakcija s membranama ključna za farmakološki učinak.¹⁷⁵ Dodatno, njihova hidrofobna priroda može pogodovati interakcijama s hidrofobnim mjestima na proteinima, enzimima ili receptorima, što može imati značajan utjecaj na njihov biološki profil i potencijalnu farmakološku aktivnost.

Usporedba vrijednosti $cLogP$ između mono- (niske $cLogP$ vrijednosti) i biskvaternih amonijevih spojeva (visoke $cLogP$ vrijednosti) upućuje na jasno izražene razlike u profilu membranske permeabilnosti i hidrofobnosti. Dok prvi pokazuju veću topljivost u vodenim medijima, ali smanjenu sposobnost penetracije kroz membrane, potonji spojevi posjeduju veći potencijal za interakciju s lipidnim fazama i biološkim membranama, što može biti prednost u određenim terapijskim aplikacijama, osobito onima koje zahtijevaju učinkovit prijelaz spoja kroz biološke barijere.

Tablica 4. Prikaz procijenjenih konsenzusnih particijskih koeficijenata ($cLogP$) i topološke polarne površine ($TPSA/\text{\AA}^2$) korišten je za molekularnu karakterizaciju ispitivanih spojeva, pri čemu su spojevi s nižim $cLogP$ vrijednostima označeni svijetloplavom, a oni s višim svijetlozelenom bojom.

Kratica spoja	$cLogP$	$TPSA/\text{\AA}^2$
QNH ₂ -C ₁₂	1,48	26,02
QNH ₂ -C ₁₄	2,12	26,02
QNH ₂ -C ₁₆	2,81	26,02
QNH ₂ -ADC ₁₂	0,81	55,12
QNH ₂ -ADC ₁₄	1,55	55,12
QNH ₂ -ADC ₁₆	2,24	55,12
QBn-C ₁₂	2,75	29,10
QBn-C ₁₄	3,46	29,10
QBn-C ₁₆	4,09	29,10
QAc-C ₁₂	1,56	29,10
QAc-C ₁₄	2,22	29,10
QAc-C ₁₆	3,01	29,10
QO-C ₁₂	1,65	17,07
QO-C ₁₄	2,29	17,07
QO-C ₁₆	2,95	17,07
2(QO) ₃	-4,17	34,14
2(QO) ₄	-4,69	34,14
2(QO) ₆	-3,80	34,14
2(QC ₁₂) ₃	2,35	24,06
2(QC ₁₂) ₄	2,93	24,06
2(QC ₁₂) ₆	3,75	24,06
2(QC ₁₄) ₃	3,86	24,06
2(QC ₁₄) ₄	4,40	24,06
2(QC ₁₄) ₆	5,29	24,06
2(QC ₁₆) ₃	5,33	24,06
2(QC ₁₆) ₄	5,69	24,06
2(QC ₁₆) ₆	6,54	24,06
CPC	3,24	3,88
BAB	3,06	0,00
OTC	4,88	31,82

4.2.4. Permeabilnost spojeva

Na temelju analize molekularnih topoloških deskriptora utvrđeno je da kvaterne amonijeve soli (QACs) izvedene iz 3-benzamidokinuklidina posjeduju povišene vrijednosti prediktivnog parametra $cLogP$, što ukazuje na povećanu lipofilnost. S obzirom na poznatu povezanost lipofilnosti i pasivne permeacije kroz lipidne barijere, ovi rezultati upućuju na potencijalno povoljniji profil membranske propusnosti. Eksperimentalna potvrda ove pretpostavke provedena je testiranjem permeabilnosti analiziranih spojeva u modelnom PAMPA sustavu.

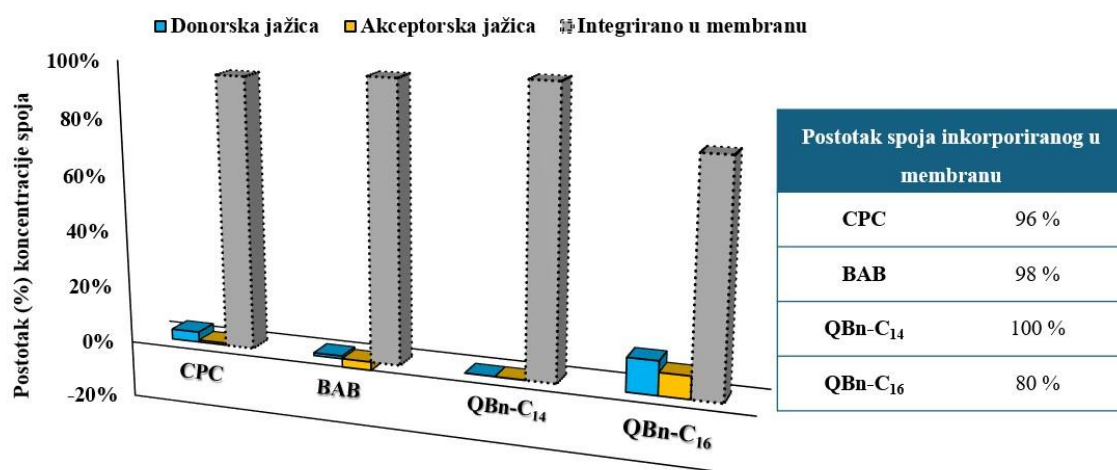
Membranska permeabilnost ispitivana je uporabom *in vitro* modela pasivne difuzije. Modelna membrana izrađena je na bazi lecitina, koji sadrži zasićene i nezasićene masne kiseline, fosforu kiselinu i kolin, čime se postiže visok stupanj strukturne i kemijske sličnosti sa staničnim membranama sisavaca.¹⁷⁶ U tu svrhu korišten je standardizirani test propusnosti kroz paralelnu umjetnu membranu (PAMPA), koji se zbog svoje metodološke robusnosti i visoke reproduktivnosti široko primjenjuje u procjeni sposobnosti pasivne difuzije potencijalnih lijekova kroz biološke membrane.¹⁷⁷ S obzirom na široku upotrebu QACs u formulacijama za topikalnu primjenu, osobito u antiseptičkim pripravcima za dezinfekciju kože, od iznimne je važnosti istražiti njihovu interakciju s fosfolipidnim membranama kako bi se predvidio njihov potencijalni toksični učinak.

Dodatno, razlog zbog kojega su upravo derivati 3-benzamidokinuklidina odabrani za ispitivanje permeabilnosti u PAMPA modelu leži u činjenici da su ti spojevi jedini među analiziranim mogli biti pouzdano identificirani spektrofotometrijski. Ova mogućnost proizlazi iz prisutnosti aromatskog sustava – benzenske jezgre – u strukturi ispitivanih molekula, koja omogućuje elektronsku delokalizaciju π -elektrona, čime dolazi do apsorpcije elektromagnetskog zračenja u UV/VIS području. Za razliku od ostalih QACs, koji ne posjeduju aromatske sustave i time nemaju izraženu apsorpciju u tom spektralnom području, derivati s benzamidnim supstituentom omogućili su precizno praćenje distribucije spojeva između donorske i akceptorske jažice te umjetne membrane. Ova spektroskopska prednost omogućila je pouzdanu evaluaciju propusnosti i inkorporacije tih spojeva u modelni membranski sustav.

Na slici 35 prikazani su udjeli (%) analiziranih kvaternih amonijevih spojeva 3-benzamidokinuklidina u donorskoj i akceptorskoj jažici mikrotitarske pločice, uz prikaz postotka spojeva inkorporiranih u umjetnu fosfolipidnu membranu.

Rezultati su pokazali da se spoj QBn-C₁₄ pretežito zadržao unutar membrane, dok je njegov strukturni analog s duljim alkilnim lancem, QBn-C₁₆, pokazao uravnoteženiju raspodjelu između membrane te donorske i akceptorske jažice. Oba spoja pokazala su relativno nizak stupanj pasivne difuzije kroz umjetnu membranu, što je usporedivo s rezultatima za komercijalno dostupne antiseptike poput cetilpiridinijeva klorida (CPC) i benzildimetildodecilamonijeva bromida (BAB). Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost smanjene citotoksičnosti ispitivanih spojeva prema stanicama sisavaca, što dodatno opravdava potrebu za daljnjim ispitivanjima putem standardiziranih *in vitro* testova toksičnosti.

Ova zapažanja, temeljena na korelaciji između cLogP vrijednosti, spektrofotometrijskih svojstava i ponašanja spojeva u modelnim membranskim sustavima, pružaju vrijedne uvide u njihov potencijal za kliničku primjenu, osobito u kontekstu topikalne terapije gdje je poželjna niska sistemska apsorpcija, ali učinkovita interakcija s površinskim strukturama kože i mikroorganizama. Nadalje, ovi rezultati mogu poslužiti kao temelj za racionalno strukturiranje kvaternih amonijevih spojeva s poboljšanim sigurnosnim i farmakodinamskim profilom.



Slika 35. Izračun raspodjele spoja i integracije u membranu nakon 24-satne inkubacije pri 37 °C.

4.3. Mikrodilucijske metode

4.3.1. Minimalna inhibitorna koncentracija mono- i biskvaternih amonijevih spojeva

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju raznoliku antibakterijsku aktivnost sintetiziranih monokvaternih amonijevih spojeva (monoKAS) izvedenih iz 3-aminokinuklidina, 3-amidokinuklidina i kinuklidin-3-ona prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, tablica 5. Očekivano, aktivnost protiv Gram-negativnih sojeva bila je niža, što se podudara s već uspostavljenim saznanjima da membranske karakteristike Gram-negativnih bakterija otežavaju penetraciju QAC spojeva. U ovom istraživanju, antibakterijska svojstva sintetiziranih QACs bila su usporediva odnosno bolja od komercijalno dostupnih kvaternih amonijevih spojeva CPC i BAB.

Kvaterne amonijeve soli 3-aminokinuklidina s dugim lancima (C₁₂, C₁₄ i C₁₆) pokazali su

antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama, iako su vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) varirale ovisno o specifičnom spoju i vrsti bakterije. Dok derivat s $\text{QNH}_2\text{-C}_{12}$ ugljikovodičnim lancem nije pokazao značajnu aktivnost, spojevi s duljim alkilnim lancima (C_{14} i C_{16}) pokazali su značajno niže MIK vrijednosti, u rasponu od 12,5 μM do 100 μM , izuzev kod rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* ($\text{MIK} \geq 100 \mu\text{M}$). Među njima, derivat $\text{QNH}_2\text{-C}_{16}$ iskazao se po izrazitoj aktivnosti protiv soja *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ($\text{MIK} = 13 \mu\text{M}$), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($\text{MIK} = 25 \mu\text{M}$), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ($\text{MIK} = 50 \mu\text{M}$) i *Bacillus cereus* ATCC 14579 ($\text{MIK} = 13 \mu\text{M}$) što je u skladu s prethodnim istraživanjima koja sugeriraju povećanu antibakterijsku aktivnost QACs s duljim alkilnim lancima. Osobito je značajan učinkovit inhibični potencijal $\text{QNH}_2\text{-C}_{16}$ protiv *Listeria monocytogenes*, budući da otpornost ovog patogena na konvencionalne metode dekontaminacije predstavlja rastući izazov u prehrambenoj industriji.¹³⁶

Dobru aktivnost QACs 3-aminokinuklidina može se objasniti i kroz prizmu protonirane primarne amino skupine na trećem ugljikovom atomu 3-aminokinuklidina pri sniženim pH vrijednostima što bi povećalo ukupnu pozitivnu nabijenost molekule te rezultiralo potencijalno poboljšanom interakcijom s negativno nabijenim komponentama bakterijske stanične stijenke i membrane. Ovo bi moglo dovesti do jače elektrostatske privlačnosti prema Gram-pozitivnim bakterijama, koje posjeduju teikoične kiseline bogate anionskim skupinama, čime bi se mogla poboljšati adsorpcija i olakšati prijenos kroz staničnu membranu.

Međutim, povećana polarnost molekule mogla bi imati dvojak učinak na antibakterijsku aktivnost. S jedne strane, povećana nabijenost mogla bi smanjiti sposobnost prolaska kroz hidrofobne slojeve lipidnih membrana, što je ključno za učinkovito djelovanje QACs. S druge strane, ako bi protonirana molekula poboljšala vezanje na specifične komponente bakterijske membrane, mogla bi se potencijalno poboljšati i antibakterijska aktivnost, osobito protiv osjetljivih Gram-pozitivnih bakterija. Kod Gram-negativnih bakterija, koje posjeduju dodatnu plazma membranu, povećana polarnost bi mogla dodatno otežati prolazak kroz hidrofobne barijere, smanjujući time učinkovitost spoja. Ovo bi moglo objasniti varijabilne MIK vrijednosti među različitim derivatima, osobito u korelaciji s duljinom alkilnog lanca, gdje hidrofobni interakcijski potencijal također igra značajnu ulogu.

Kvaterne amonijeve soli s dugim amidnim lancima (ADC_{12} , ADC_{14} i ADC_{16}) nisu pokazali antibakterijsku aktivnost na panelu Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija ($>100 \mu\text{M}$). Prisutnost polarnih skupina, kao što su primarna amino skupina ($-\text{NH}_2$) na trećem ugljikovom atomu kinuklidina i amidna skupina ($-\text{CONH}-$) na ugljikovodičnom dijelu lanca igra ključnu ulogu u

određivanju fizikalno-kemijskih svojstava kvaternih amonijevih spojeva te posljedično utječe na njihovu antibakterijsku aktivnost. Amino skupina povećava polarnost molekule i omogućuje stvaranje vodikovih veza s membranskim lipidima ili proteinima, no njezina protonacija ovisna o pH vrijednosti može utjecati na sposobnost prolaska kroz bakterijsku membranu. S druge strane, amidna skupina doprinosi hidrofilnosti i stabilnosti spoja, ali istovremeno može smanjiti njegovu sposobnost umetanja u hidrofobni lipidni dvosloj membrane. Dok dugi alkilni lanci QACs obično olakšavaju disrupciju lipidnih membrana, njihova kombinacija s amidnim skupinama može smanjiti mobilnost molekule unutar membrane i povećati njezinu sklonost agregaciji samih QAC molekula. Ova kombinacija svojstava dovodi do smanjene interakcije s bakterijskim membranama, steričkih prepreka i ograničene difuzije kroz stanične membrane, što može objasniti neaktivnost ovih spojeva pri koncentracijama >100 μM . Rezultati istraživanja sugeriraju da iako polarne skupine mogu povećati interakcije s membranama, njihova prisutnost može negativno utjecati na antibakterijsku učinkovitost zbog smanjene penetracije kroz lipidne slojeve.

Kvaterne amonijeve soli 3-benzamidokinuklidina s dugim alkilnim lancima (C_{12} , C_{14} i C_{16}) koji u produžetku polarne amidne skupine sadrže hidrofobni benzenski prsten na trećem ugljikovom atomu molekule kinuklidina, pokazali su značajnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija, posebice spojevi s dugim lancima QBn- C_{14} i QBn- C_{16} . Njihova povećana lipofilnost vjerojatno je olakšala interakciju s lipidnim dvoslojem bakterijskih membrana, što je doprinijelo poboljšanoj aktivnosti. Nadalje, prisutnost velikog aromatskog sustava mogla je povećati stabilnost interakcija s membranskim komponentama, čime se poboljšava afinitet prema bakterijskoj membrani. S druge strane, benzilirani derivati, posebice QBn- C_{14} (MIK = 31 μM) i QBn- C_{16} (MIK = 31 μM i 63 μM), iskazali su umjerenu aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* i *Salmonella enterica*. Nadalje, QBn- C_{14} je pokazao određenu inhibicijsku aktivnost i protiv *Pseudomonas aeruginosa*, premda pri visokoj koncentraciji (63 μM). Ovi rezultati sugeriraju da prisutnost hidrofobnog aromatskog prstena u QBn spojevima značajno poboljšava njihovu membransku permeabilnost i antibakterijski učinak smanjujući utjecaj polarne amidne veze.

Kvaterne amonijeve soli kinuklidin-3-ona s dugim alkilnim lancima (C_{12} , C_{14} i C_{16}) također su pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost, pri čemu su spojevi s duljim alkilnim lancima (C_{14} i C_{16}) imali značajno niže MIK vrijednosti u odnosu na C_{12} analog. Najizraženija aktivnost uočena je kod QO- C_{14} i QO- C_{16} protiv *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA ATCC 33591 (MIK = 8 - 16 μM) i *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (MIK = 4 - 16 μM). Usporedba s QBn- C_{14} pokazala je da je QBn- C_{14} bio učinkovitiji protiv *Listeria monocytogenes* (MIK = 4 μM), dok su QACs kinuklidin-3-

ona pokazali bolje antibakterijsko djelovanje protiv Gram-pozitivnih bakterija. Odnos strukture i aktivnosti ovih spojeva pokazala je da prisutnost polarnog supstituenta može imati dvojak učinak na antibakterijska svojstva QACs. Uspoređujući antibakterijsku aktivnost QACs, kinuklidin-3-ona i 3-benzamidokinuklidina, primjećeno je da derivati kinuklidin-3-ona pokazuju aktivnost protiv većeg broja Gram-pozitivnih bakterija, uz niske minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) protiv *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 i kliničkog izolata *Staphylococcus aureus* MRSA. Povećana aktivnost QBn spojeva uočena je kod *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (MIK = 4 μ M) i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (MIK = 4 - 8 μ M).

Biološka aktivnost ispitivanih QACs kinuklidin-3-ona pokazala je ovisnost o prirodi supstituenta na C-3 položaju kinuklidinske jezgre. Uvođenje duljih alkilnih lanaca (C_{14} – C_{16}) značajno je povećalo antibakterijsku aktivnost, naglašavajući važnost hidrofobnih interakcija u njihovom mehanizmu djelovanja. Stoga je jasno da ravnoteža između hidrofilnih i hidrofobnih svojstava ima ključnu ulogu u optimizaciji antimikrobnog učinka, a učinak polarnih skupina ovisi o ukupnoj strukturi molekule.

Kvaterne amonijeve soli 3-acetamidokinuklidina s dugim alkilnim lancima (C_{12} , C_{14} i C_{16}) koji imaju samo metilnu skupinu u produžetku amidne veze umjesto benzilnog prstena, pokazali su znatno slabiju antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama (>125 μ M). Neaktivnost se posljedično može objasniti steričkom preprekom amidne skupine. Amidna skupina može ometati klasičan mehanizam djelovanja kvaternih amonijevih spojeva, koji se temelji na interakciji s bakterijskim membranama i njihovoj disrupciji. Amidna funkcionalna grupa povećava polarnost, ali također može otežati umetanje molekula u lipidni dvosloj bakterijske membrane, što nije slučaj kod benziliranih kandidata, budući da je tamo polarnost amidne skupine maskirana hidrofobnim benzenskim prstenom.

Budući da antibakterijska aktivnost monokvaternih amonijevih spojeva (QACs) nije određena isključivo jednim faktorom, već proizlazi iz kompleksnog međudjelovanja više strukturnih i fizikalno-kemijskih svojstava, nužno je svaku molekulu analizirati pojedinačno. Ključni čimbenici koji doprinose ukupnoj aktivnosti uključuju prirodu i položaj supstituenata, hidrofilno-hidrofobnu ravnotežu, rigidnost okosnice, vrstu i raspored alkilnih lanaca te distribuciju naboja, uključujući prisutnost rezonantnih struktura. Kombinacija ovih elemenata ima presudnu ulogu u modulaciji antibakterijske aktivnosti, čime se dodatno naglašava potreba za preciznim strukturiranjem spojeva u cilju optimizacije njihove učinkovitosti.

Rezultati ovog istraživanja značajno doprinose dubljem razumijevanju odnosa između strukture i aktivnosti QACs. Dobiveni uvidi mogu poslužiti kao temelj za racionalni dizajn novih, učinkovitijih i

ekološki prihvatljivijih kvaternih amonijevih spojeva, s potencijalom za poboljšanu selektivnost i smanjenje razvoja bakterijske rezistencije.

Prekursori biskvaternih amonijevih soli kinuklidin-3-ona s različitom duljinom poveznica (3, 4 i 6 ugljikovih atoma) su pokazala biološku inaktivnost ($MIK = > 75 \mu M$) koja proizlazi iz zarobljenosti dva kvaterna centra s različitom duljinom poveznica te utjecaja dviju polarnih karbonilnih skupina. Također, ta činjenica se može opravdati i izrazito niskom lipofilnošću, što upućuje na to da su ovi spojevi vrlo hidrofilni (tj. ima veliku topljivost u vodi i mali afinitet prema lipidima) koja u kombinaciji s izrazito velikom polarnošću dovodi do njihove neaktivnosti. Problemi s membranskom penetracijom mogu nastati jer takvi spojevi obično imaju smanjenu sposobnost prodiranja u lipidne bakterijske membrane. Bez te sposobnosti, spojevi mogu biti neučinkoviti u ostvarivanju svog antibakterijskog mehanizma djelovanja.

Nove varijante sintetiziranih biskvaternih amonijevih spojeva pokazala su biološku aktivnost na panelu Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, tablica 6. Iz dobivenih rezultata za određenu minimalnu inhibitornu koncentraciju biskvaternih amonijevih spojeva eksperimentalno je utvrđeno da udaljenost dva pozitivno nabijena kvaterna dušikova centra značajno utječe na antibakterijsku aktivnost – kod uvođenja kraćih poveznica molekula može postati previše rigidna, što može smanjiti njezinu sposobnost interakcije s membranom, dulji poveznici mogu poboljšati fleksibilnost, omogućavajući molekuli da bolje prilagodi svoj oblik kako bi destabilizirala membranu lipidnog dvosloja, dok predugi poveznici mogu smanjiti aktivnost jer molekula može postati previše fleksibilna i izgubiti strukturnu organizaciju potrebnu za optimalnu interakciju. Optimalna duljina poveznica omogućuje bolje vezanje na bakterijske membrane, povećanu permeabilizaciju i posljedično jači antibakterijski učinak.

Kod biskvaternih amonijevih spojeva sa različitom duljinom alkilnog lanca opažamo bolju antibakterijsku aktivnost koja je u korelaciji s povećanjem duljine alifatskog poveznica. Nove varijante sintetiziranih biskvaternih amonijevih spojeva pokazala su biološku aktivnost na panelu Gram-pozitivnih bakterija: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 33591, *B. cereus* ATCC 14579, *L. monocytogenes*, *E. faecalis* ATCC 29212 u intervalu MIK vrijednosti od 4,68 do 37,5 μM te panelu Gram-negativnih bakterija: *E. coli* ATCC 25922 u intervalu od 18,75 do 37,5 μM koncentracije.

Bolja antibakterijska aktivnost biskvaternih amonijevih soli kinuklidina (bisQACs) na meticilin-rezistentnom soju *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 u usporedbi s osjetljivim sojem ATCC 25923 može se povezati s strukturnim i funkcionalnim prilagodbama membrane koje su povezane s rezistencijskim mehanizmima. Prisutnost efluksnih pumpi u soju ATCC 33591 ne samo da omogućuje aktivno izbacivanje kationskih spojeva, već može biti povezana s promjenama u sastavu membrane, uključujući potencijalno povećanu negativnu nabijenost i modifikacije lipidnog dvosloja. Ove promjene u strukturi membrane mogu potencijalno povećati elektrostatske interakcije s biskvaternim amonijevim spojevima.¹⁰⁹ Nadalje, poznato je da bakterijski sojevi s razvijenom rezistencijom često pokazuju rigidniju membransku strukturu kao mehanizam obrane, što može povećati osjetljivost na membranolitičke spojeve poput bisQACs, unatoč njihovoj otpornosti na druge antimikrobne agense. S druge strane, osjetljivi soj ATCC 25923, koji ne posjeduje rezistencijske gene za efluks pumpe, može imati manju negativnu nabijenost membrane i veću fluidnost lipidnog dvosloja, što može rezultirati slabijom interakcijom s bisQACs te učinkovitijim popravkom membranskih oštećenja.¹³⁷ Ovi rezultati sugeriraju potencijal biskvaternih amonijevih soli kao antimikrobnih sredstava protiv multirezistentnih sojeva, osobito onih s promijenjenim fizikalno-kemijskim svojstvima membrane zbog selekcijskog pritiska uzrokovanog antimikrobnim reagensima.

Tablica 5. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) novosintetiziranih monokvaternih amonijevih spojeva derivata 3-supstituiranog kinuklidina u μM koncentraciji.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)/μM										
Spojevi	M_r	Gram-Pozitivne						Gram-Negativne		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i> food isolate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		ATCC25923	ATCC33591	Clinical/MRSA	ATCC14579	ATCC7644	ATCC29212	ATTC25922		ATTC27853
QNH₂-C₁₂	375,44	100	>100	>100	100	100	100	>100	>100	>100
QNH₂-C₁₄	403,49	25	100	>100	25	50	100	100	>100	>100
QNH₂-C₁₆	431,55	25	100	>100	13	13	50	100	>100	>100
QNH₂-ADC₁₂	432,49	>100	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100
QNH₂-ADC₁₄	460,55	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
QNH₂-ADC₁₆	488,60	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
QO-C₁₂	374,41	62,5	125	125	>250	125	>250	>250	>250	>250
QO-C₁₄	402,46	8	16	16	63	16	63	63	63	250
QO-C₁₆	430,52	8	8	8	31	4	63	31	63	>250
QBn-C₁₂	479,55	63	63	63	63	31	31	63	63	>125
QBn-C₁₄	507,60	31	31	31	63	4	8	31	31	63
QBn-C₁₆	535,66	63	63	31	63	4	4	31	63	>125
QAc-C₁₂	417,48	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
QAc-C₁₄	445,53	>125	>125	>125	>125	63	63	>125	>125	>125
QAc-C₁₆	473,58	>125	>125	>125	>125	8	31	>125	>125	>125
CPC	340	4	6	8	16	8	8	16	63	250
BAB	384,40	10	25	25	13	10	15	63	50	>125

Tablica 6. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) novosintetiziranih biskvaternih amonijevih spojeva derivata 3-supstituiranog kinuklidina u μM koncentraciji.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)/ μM										
Spojevi	M_r	Gram-Pozitivne						Gram-Negativne		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33591	<i>Staphylococcus aureus</i> Clinical/MRSA	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	<i>Escherichia coli</i> ATTC25922	<i>Salmonella enterica</i> food isolate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC27853
2(QO)₃	452,23	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75
2(QO)₄	466,26	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75
2(QO)₆	494,31	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75
2(QC₁₂)₃	790,94	75	75	>75	>75	38	>75	>75	75	>75
2(QC₁₂)₄	804,97	>75	75	>75	>75	75	>75	>75	>75	>75
2(QC₁₂)₆	833,02	75	19	>75	>75	38	75	38	>75	>75
2(QC₁₄)₃	847,05	75	75	>75	>75	38	>75	>75	>75	>75
2(QC₁₄)₄	861,08	>75	75	>75	>75	>75	>75	>75	>75	>75
2(QC₁₄)₆	889,32	38	19	75	75	19	38	19	75	>75
2(QC₁₆)₃	903,16	38	19	>75	>75	9	>75	>75	>75	>75
2(QC₁₆)₄	917,19	75	9	75	>75	9	38	19	75	>75
2(QC₁₆)₆	945,24	9	5	38	75	19	38	19	75	>75

4.3.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti monokvaternih amonijevih spojeva u različitim hranidbenim medijima

U prethodnim istraživanjima pokazano je da vrsta i sastav hranjivog medija značajno utječu na izražena antibakterijska svojstva kvaternih amonijevih spojeva (QACs).³ Jedan od ključnih faktora koji utječe na ovu aktivnost je prisutnost aniona u mediju, čiji naboj može ometati elektrostatski kontakt amfifilnih molekula sa membranom bakterija. S obzirom na ovo, kako bi se detaljnije procijenila uloga sastava medija u modifikaciji antibakterijskih svojstava odabranih potencijalnih spojeva protiv *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 proveli smo dodatne testove u dva različita medija: MH obogaćen kationima Na^+ i Mg^{2+} (CA-MH) i jednostavni Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM).

Glavni sastojak Mueller-Hinton medija (MH) je hidrolizat kazeina, koji služi kao izvor peptida niske molekularne mase i negativno nabijenih aminokiselina. Ove negativno nabijene molekule mogu inhibirati elektrostatsku privlačnost i vezanje kvaternih amonijevih spojeva (QACs) za komponente bakterijske stanične stijenke koje također nose negativan naboj. Stoga prisutnost tih molekula može smanjiti učinkovitost antimikrobnih sredstava, osobito QACs, sprječavanjem elektrostatske interakcije s površinom bakterijske stanice.

Kationima prilagođeni Mueller-Hinton medij (CA-MH), s dodatkom natrija i magnezija u obliku monovalentnih i dvovalentnih kationa, uobičajeno se koristi u testovima osjetljivosti na antimikrobne tvari kod Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. U mediju obogaćenom kationima (CA-MH) prisutni su monovalentni i dvovalentni kationi (Na^+ i Mg^{2+}), čija je primarna uloga neutralizacija negativnog učinka molekula prirodno prisutnih u MH-u, posebice hidrolizata kazeina, s ciljem pojačanja antimikrobne aktivnosti kvaternih amonijevih spojeva (QACs). Dodavanje metalnih kationa služi za neutralizaciju utjecaja negativno nabijenih molekula nastalih razgradnjom kazeinskih hidrolizata, poput negativno nabijenih peptida i aminokiselina, čime se povećava učinkovitost QACs. Vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) u CA-MH-u, u prisutnosti kvaternih soli 3-aminokinuklidina i kinuklidin-3-ona, ostaje nepromijenjena, što je prikazano na slici 36. Jedno od mogućih objašnjenja za nepromijenjenu MIK vrijednost jest da su koncentracije QACs korištene u eksperimentu već bile dovoljno visoke za postizanje maksimalne antimikrobne učinkovitosti, čak i u prisutnosti metalnih kationa. U tom slučaju, prisutnost kationa u ispitivanim koncentracijama ne djeluje značajno na učinkovitost QACs, pri čemu dodatni utjecaj kationa više ne doprinosi povećanju aktivnosti, što rezultira odsustvom promjene u MIK vrijednosti.

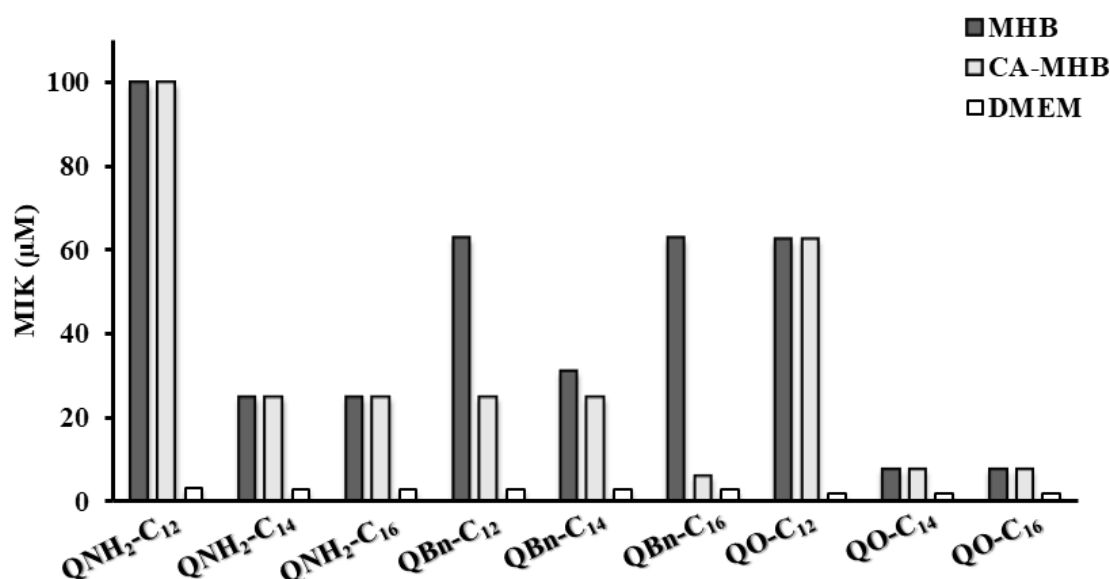
Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) QACs 3-benzamidokinuklidina značajno su opale, u

rasponu od jednog do deset puta. Najizraženije smanjenje MIK vrijednosti zabilježeno je kod spoja QBn-C₁₆, što ukazuje na njegovu povećanu antimikrobnu učinkovitost. Vjerojatno QACs 3-bezamidokinuklidina ostvaruju sinergistički učinak s kationima metala na površini bakterijske stanice, vezujući se za negativno nabijene skupine poput teikoičnih kiselina. Na taj način mogu oponašati lokalni višak pozitivnog naboja, slično kao bisQACs, što potencijalno doprinosi snažnijoj elektrostatskoj interakciji s bakterijskom membranom i time poboljšanoj antimikrobnoj aktivnosti. Kako bi se dodatno istražio utjecaj sastava hranjivih tvari u mediju, određene su MIK vrijednosti u relativno jednostavnom Dulbeccovom modificiranom Eagleovom mediju (DMEM), koji sadrži različite hranjive komponente namijenjene podržavanju rasta eukariotskih stanica. Komponente DMEM-a uključuju: glukozu, koja predstavlja primarni izvor ugljika za proizvodnju energije i rast bakterija; glutamin, ključan za sintezu proteina i metabolizam dušika; natrijev piruvat, koji služi kao izvor energije i može doprinijeti održavanju staničnog metabolizma; lipoičnu kiselinu, koja sudjeluje u enzimskim reakcijama, osobito u oksidativnom metabolizmu; vitamin B12 i biotin, esencijalne vitamine za bakterijski metabolizam, uključene u različite enzimске procese; askorbinsku kiselinu, koja djeluje kao kofaktor u mnogim enzimskim reakcijama i snažan je antioksidans te fenol crveno, često korišteno kao pH indikator za praćenje promjena u mediju tijekom bakterijskog rasta (npr. proizvodnje kiselina).¹³⁸

U usporedbi s MIK vrijednostima utvrđenim u CA-MH, u DMEM-u su zabilježene niže MIK vrijednosti za sve ispitivane kandidate spojeva. Spojevi su pokazali vrlo dobru antibakterijsku aktivnost u DMEM-u s MIK vrijednostima u rasponu od 1,95 do 3 μ M, pri čemu je inicijalni MIK smanjen do 33 puta.

Jedno moguće objašnjenje za ovaj fenomen je odsutnost anionskih peptida i aminokiselina u DMEM-u ili potencijalni sinergijski učinak ispitivanih spojeva s drugim antimikrobnim agensima prisutnima u DMEM-u (npr. lipoična kiselina i askorbinska kiselina). Također, prisutnost hranjivih tvari može utjecati na interakciju između antimikrobnih reagensa i bakterija. Primjerice, glukoza i drugi bakterijski metaboliti mogu mijenjati sastav stanične stijenke i membrane bakterija, čime se može izmijeniti način vezanja kvaternih amonijevih spojeva (QACs) i drugih antimikrobnih reagensa na bakterijsku stanicu.

Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da sastav hranidbenog medija ima ključnu ulogu u određivanju minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antimikrobnih reagensa. Koncentracija i vrsta tvari u mediju mogu značajno utjecati na učinkovitost antimikrobnog spoja te na brzinu i stanje rasta bakterija.



Slika 36. Minimalne inhibitorne koncentracije (µM) određene su u Mueller-Hinton mediju (MH), kationima obogaćen MH-u (CA-MH) i Dulbeccoovom modificiranom Eagleovom mediju (DMEM) za mono- i biskvaternih amonijevih spojeva 3-supstituiranog kinuklidina.

4.3.3. Kinetika inhibicije bakterijskog rasta mono- i biskvaternih amonijevih spojeva

Prisutnost antibakterijskog sredstva može značajno utjecati na dinamiku rasta bakterija, omogućavajući preciznije razlikovanje u djelovanju različitih antimikrobnih reagensa. Stoga, uz standardne testove osjetljivosti, poput metode mikrodilucije za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), vremenski razlučena analiza bakterijskog rasta pruža detaljniji uvid u kinetiku bakterijskog odgovora na prisutnost antimikrobnih spojeva.¹³⁹

Ova metoda omogućava kontinuirano praćenje promjena u bakterijskoj populaciji kroz parametre poput vremena adaptacije (*engl.* lag phase), brzine eksponencijalnog rasta i potencijalne pojave tolerancije ili rezistencije tijekom duljih perioda izlaganja. Lag faza ili faza kašnjenja je početna faza bakterijskog rasta u kojoj stanice ne proliferiraju odmah nakon inokulacije u svježi medij, već prolaze kroz metaboličku prilagodbu novim uvjetima okoline. Tokom lag faze, bakterije sintetiziraju enzime, reguliraju ekspresiju gena i obnavljaju intracelularne komponente potrebne za aktivan rast. Trajanje ove faze ovisi o različitim faktorima, uključujući sastav hranjivog medija, prethodno stanje bakterijske

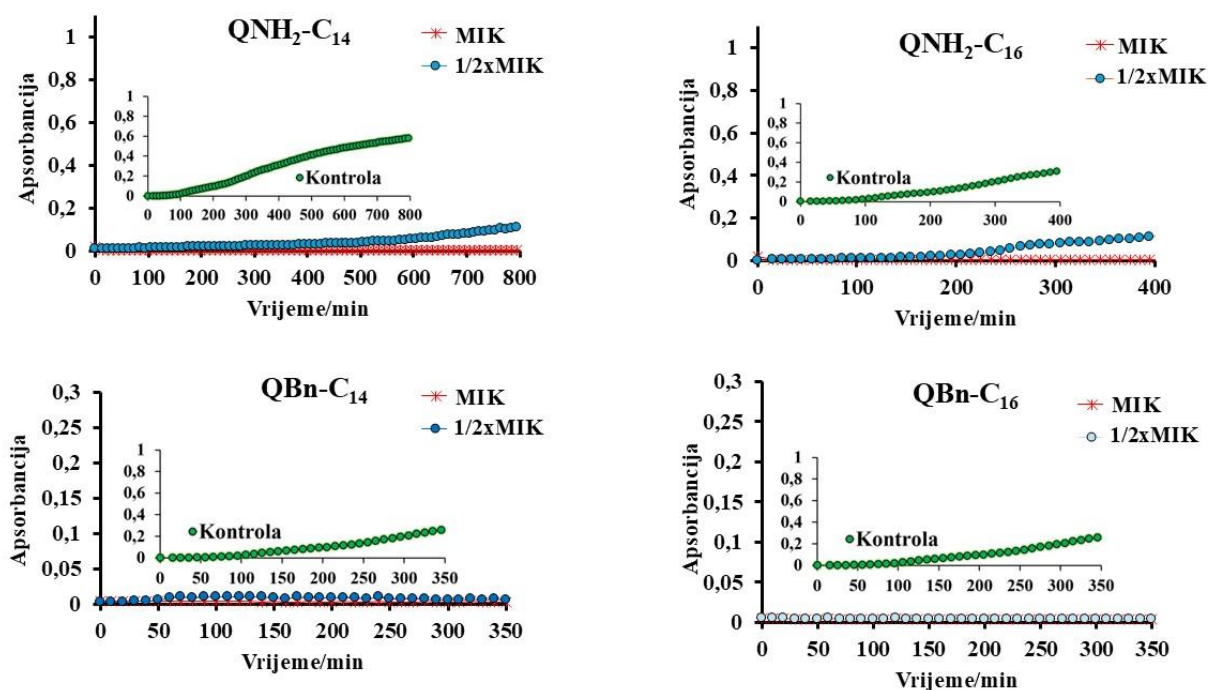
populacije i prisutnost stresa, poput antimikrobnih sredstava.¹⁴⁰

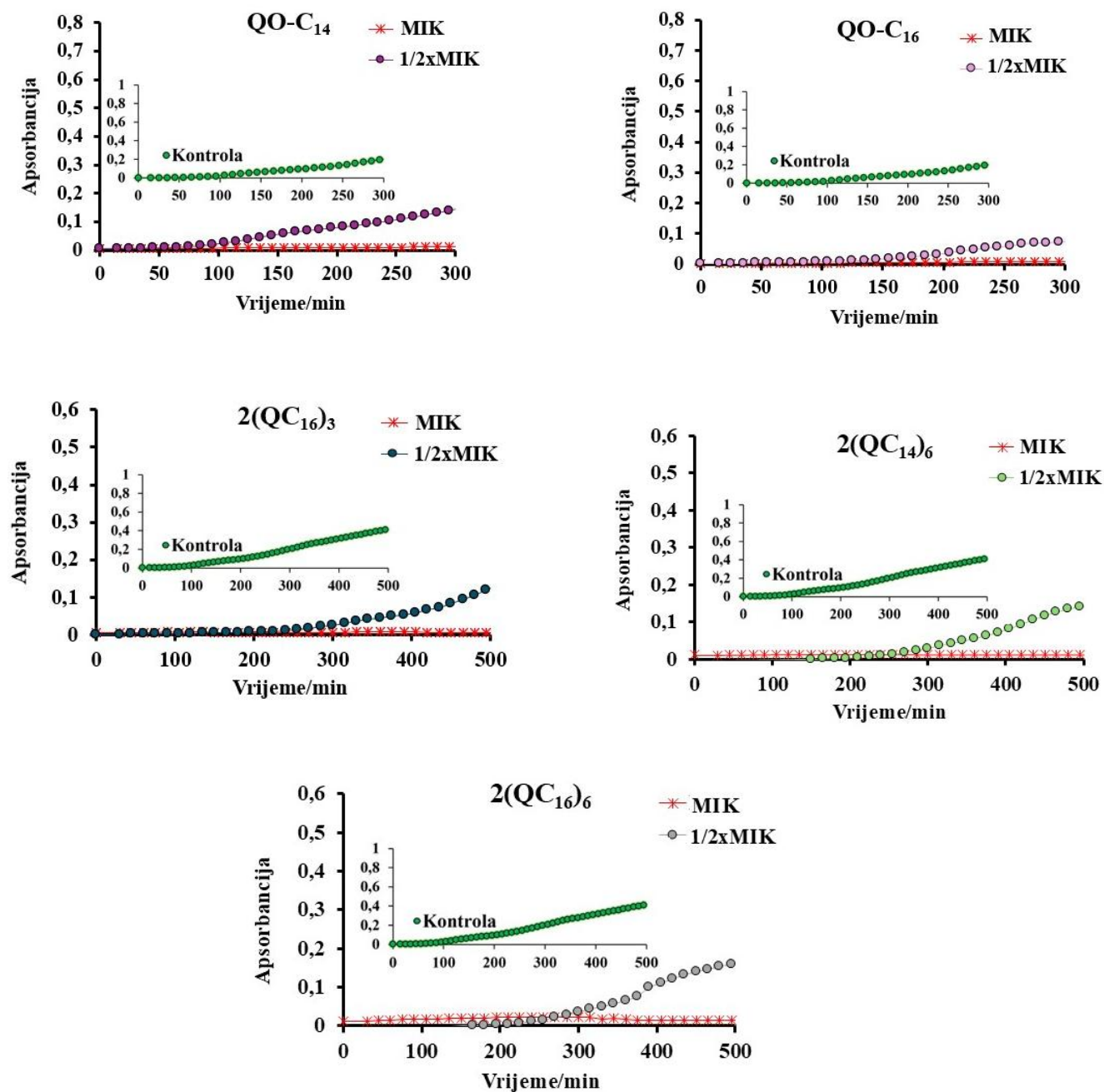
Preciznim bilježenjem ovih promjena moguće je bolje razumjeti mehanizme djelovanja ispitivanih spojeva, njihovu farmakodinamičku učinkovitost te potencijalne prilagodbe bakterija.

Takav pristup nadopunjuje klasične metode ispitivanja osjetljivosti i omogućava dublje razumijevanje interakcije između bakterija i antimikrobnih sredstava, što je ključno za optimizaciju terapijskih strategija i razvoj novih antimikrobnih reagensa.

U okviru ove doktorske disertacije, provedeni su eksperimenti kinetike inhibicije bakterijskog rasta na dvjema bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 i *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 kako bi se dodatno istražila učinkovitost odabranih kandidata monokvaternih i biskvaternih amonijevih spojeva.

Budući da je utvrđeno da spojevi monokvaternih QNH₂-C₁₄, QNH₂-C₁₆, QBn-C₁₄, QBn-C₁₆, QO-C₁₄, QO-C₁₆ i biskvaternih amonijevih spojeva 2(QC₁₆)₃, 2(QC₁₄)₆, 2(QC₁₆)₆ imaju dobar učinak na Gram-pozitivnu bakteriju *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, kinetika inhibicije rasta je detaljno proučavana na ovoj bakteriji, slika 37.





Slika 37. Kinetike rasta *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tijekom određenog vremenskog intervala inkubacije bez antibakterijskog sredstva (kontrola) te na MIK i ½ MIK vrijednostima potentnih kandidata monokvaternih amonijevih spojeva.

Kao što je prikazano na slici 37, rast bakterija bio je u potpunosti inhibiran pri koncentracijama koje odgovaraju minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK). Međutim, pri subMIK ($\frac{1}{2}$ MIK), uočene su varijacije među ispitivanim spojevima u kontekstu inhibicije bakterijskog rasta. Najizraženije razlike zabilježene su u trajanju lag faze, koja predstavlja period prilagodbe bakterija na nove uvjete prije početka eksponencijalne faze rasta. S obzirom na to da lag faza primarno reflektira fiziološke prilagodbe stanica, a ne njihovu proliferaciju, detaljna analiza kinetike rasta tijekom ove faze može pružiti uvid u suptilne razlike u mehanizmima djelovanja antibakterijskih reagensa. Netretirana kontrola pokazala je tipičan bakterijski rast *S. aureusa*, s početnom fazom kašnjenja nakon koje je uslijedio eksponencijalni rast, dostižući plato kako je kultura ušla u stacionarnu fazu.

Primjerice, spoj QNH₂-C₁₄ pokazao je sposobnost inhibicije bakterijskog rasta na $\frac{1}{2}$ MIK tijekom prvih 8 sati, dok je QNH₂-C₁₆ imao znatno kraću lag fazu te je suzbijao rast bakterija samo unutar prvih 3 sata. Ovi rezultati sugeriraju da je QNH₂-C₁₄ učinkovitiji inhibitor u odnosu na QNH₂-C₁₆, što je u skladu s prethodnim provedenim istraživanjima za kvaternne amonijeve spojeve kinuklidin-3-ola s alkilnim lancima duljine 14 ugljikovih atoma.¹⁵ Slične rezultate su objavili i drugi autori, pri čemu je uočena veća učinkovitost QACs s kraćim alkilnim lancima, vjerojatno zbog bolje topljivosti u vodenim medijima u usporedbi s derivatima koji imaju ≥ 14 C-atoma u alkilnom lancu.¹⁴¹

Zaključno, rezultati ovog eksperimenta potvrđuju da QNH₂-C₁₄ i QNH₂-C₁₆ posjeduju antibakterijsku aktivnost pri koncentracijama ispod MIK-a, iako s različitim stupnjem učinkovitosti. Ovi nalazi upućuju na njihov potencijal kao kandidata za razvoj novih antibakterijskih sredstava.

Kandidati monokvaternih amonijevih spojeva 3-benzamidokinuklidina, QBn-C₁₄ i QBn-C₁₆ učinkovito su suzbili rast bakterijske populacije unutar eksperimentalnog razdoblja od ~6 h. Sposobnost QACs da inhibira rast bakterija pri koncentracijama ispod MIK-a već je dokazana u prethodnim studijama s QACs izvedenim iz benzilimidazola i kinuklidin-3-ola.^{13,15} U tim studijama, neki kandidati za antimikrobne reagense pokazali su supresiju rasta bakterija čak i na $\frac{1}{4}$ MIK -a, što ukazuje na bolju antibakterijsku učinkovitost tih kandidata. Kinetika bakterijskog rasta u prisustvu antimikrobnih reagensa i MIK podaci sugeriraju da identificirani kandidati doista pokazuju obećavajući antibakterijski potencijal.

Kandidati kvaternih amonijevih spojeva kinuklidin-3-ona, QO-C₁₄ i QO-C₁₆ pokazuju sličnu početnu log fazu rasta, gdje je kandidat QO-C₁₆ pokazao bolje inhibitorno djelovanje tijekom eksponencijalne faze rasta u usporedbi s njegovim analogom QO-C₁₄. Prethodna istraživanja pokazala su da na antibakterijsko djelovanje kvaternih amonijevih spojeva (QACs) utječu različiti strukturni čimbenici, među kojima značajnu ulogu ima njihova sposobnost formiranja vodikovih veza.¹⁴² Ova vrsta

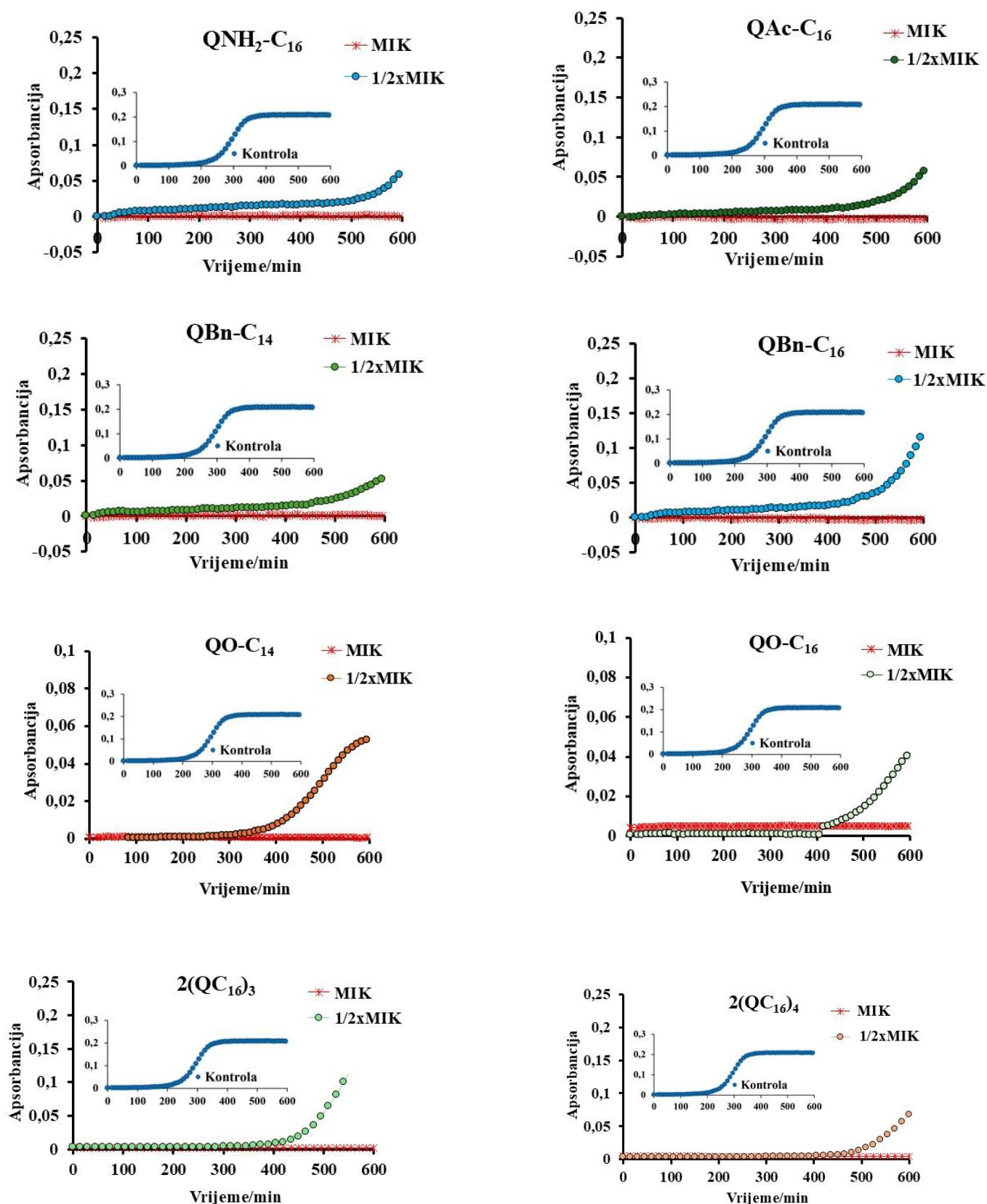
interakcije može povećati afinitet QACs prema biološkim makromolekulama, uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline na površini bakterijskih stanica.¹² Posebno je važno istaknuti da jača interakcija između QACs i negativno nabijene bakterijske membrane može doprinijeti povećanoj antibakterijskoj učinkovitosti spoja, omogućujući bolju penetraciju u staničnu stijenku i inducirajući strukturne promjene koje rezultiraju bakterijskom lizom.

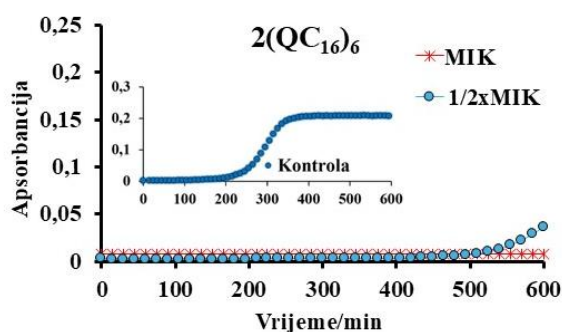
Osim elektrostatskih interakcija, hidrofilnost QACs također igra ključnu ulogu u njihovoj biološkoj aktivnosti. Naime, polarni QACs obično pokazuju veću topljivost u vodenom mediju, što izravno utječe na njihovu biodostupnost u mikrokolišu bakterijskih stanica. Povećana topljivost ne samo da produljuje vrijeme kontakta spoja s bakterijskom membranom, već može i poboljšati njegovu učinkovitost kao dezinficijensa ili antiseptika, omogućujući bolju distribuciju unutar vodenih sustava. Ovi aspekti strukturnih značajki QACs ključni su za razumijevanje njihovog mehanizma djelovanja i daljnju optimizaciju antibakterijskih svojstava.¹⁴³

Biskvaterni amonijevi spojevi u potpunosti su inhibirali bakterijski rast pri minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK) tijekom vremenskog intervala od 8 sati. Analiza početne lag faze bakterijskog rasta pri subinhibitornoj koncentraciji pokazala je slične trendove rasta unutar promatranog vremenskog razdoblja. Međutim, pri usporedbi eksponencijalnih faza rasta, kandidat spoja $2(QC_{14})_6$ pokazao je blaži nagib krivulje rasta u odnosu na svoja dva strukturna analoga $2(QC_{16})_3$ i $2(QC_{16})_6$ što sugerira sporiju stopu bakterijske proliferacije. Ovi rezultati upućuju na potencijalne razlike u mehanizmu djelovanja ili interakciji ovog spoja s bakterijskom staničnom membranom, što može biti posljedica varijacija u hidrofobnosti, topološkoj raspodjeli naboja ili sposobnosti penetracije kroz lipidni dvosloj. Daljnja kinetička i strukturna ispitivanja nužna su za bolje razumijevanje ovih varijacija i njihove implikacije na antibakterijsku aktivnost.

Budući da je utvrđeno da spojevi monokvaternih QNH_2-C_{16} , $QAc-C_{16}$, $QBn-C_{14}$, $QBn-C_{16}$, $QO-C_{14}$, $QO-C_{16}$ i biskvaternih amonijevih spojeva $2(QC_{16})_3$, $2(QC_{16})_4$, $2(QC_{16})_6$ imaju dobar učinak na Gram-pozitivnu bakteriju *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, kinetika inhibicije rasta je nadalje detaljno proučavana na ovom soju, slika 38.

Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana





Slika 38. Kinetika rasta bakterije *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 tijekom određenog vremenskog intervala inkubacije bez antibakterijskog sredstva (kontrola) te na MIK i $\frac{1}{2}$ MIK vrijednostima potentnih kandidata monokvaternih amonijevih spojeva.

Kandidati monokvaternih amonijevih spojeva s ugljikovodičnim lancem od 14 ugljikovih atoma, QBn-C₁₄ i QO-C₁₄, u potpunosti inhibiraju rast bakterija pri koncentracijama koje odgovaraju minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK). U slučaju spoja QBn-C₁₄, tijekom log faze rasta pri subinhibitornoj koncentraciji, bakterijska proliferacija započinje nakon 3 sata, dok spoj QO-C₁₄ pokazuje odgođeni trend rasta, pri čemu se bakterijska populacija povećava tek nakon 5 sati unutar 24-satnog vremenskog intervala praćenja.

Analozi kvaternih amonijevih spojeva s ugljikovodičnim lancem od 16 ugljikovih atoma, QNH₂-C₁₆, QAc-C₁₆, QBn-C₁₆ i QO-C₁₆, pokazuju potpunu inhibiciju rasta bakterijske populacije *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 pri MIK vrijednostima. U log fazi rasta pri subinhibitornoj koncentraciji, spoj QO-C₁₆ iskazao je najučinkovitije antibakterijsko djelovanje, budući da je bakterijska proliferacija zabilježena tek nakon 6 sati tijekom 24-satnog promatranog intervala. Usporedbom nagiba eksponencijalne faze rasta utvrđeno je da spoj QNH₂-C₁₆ ima niži nagib u odnosu na njegove analoge, QAc-C₁₆ i QBn-C₁₆, što upućuje na sporiji rast bakterijske populacije u njegovoj prisutnosti.

Biskvaterni amonijevi spojevi 2(QC₁₆)₃, 2(QC₁₆)₄ i 2(QC₁₆)₆ pokazuju izražen inhibitorni učinak na rast bakterijske populacije. Analiza subinhibicijskih koncentracija ukazuje na to da je log faza rasta najviše odgođena u prisutnosti spoja s poveznicom duljine 6, zatim s poveznicom duljine 4, dok je najmanje odgođena s poveznicom duljine 3. U skladu s prethodnim istraživanjima drugih autora, rezultati sugeriraju da povećana međusobna udaljenost kvaternih dušikovih centara unutar molekule doprinosi poboljšanoj i dugotrajnijoj antibakterijskoj aktivnosti.¹⁴⁴

Netretirana kontrola pokazala je tipičan bakterijski rast *L. monocytogenes*, s početnom fazom kašnjenja nakon koje je uslijedio eksponencijalni rast, dostižući plato kako je kultura ušla u stacionarnu fazu.

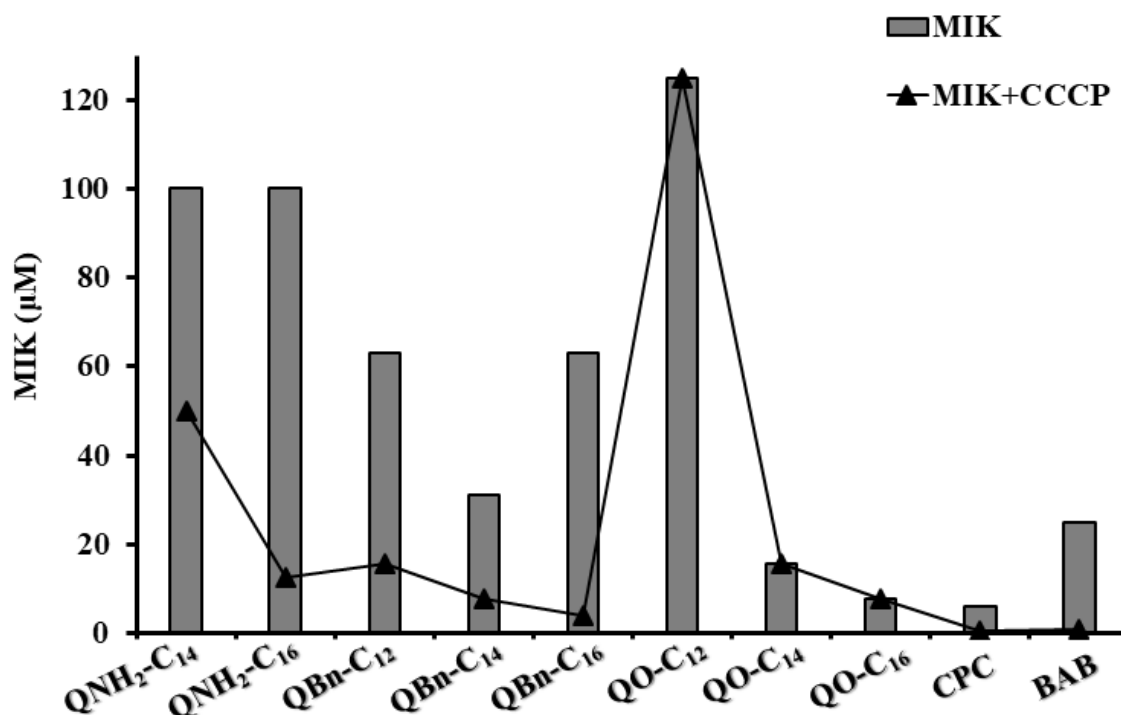
4.3.4. Potencijal razvoja bakterijske rezistencije mono- i biskvaternih amonijevih spojeva

S obzirom na potencijalnu primjenu identificiranih monokvaternih 3-supstituiranih kinuklidinijevih derivata, dodatno je istražen njihov potencijal za indukciju bakterijske rezistencije. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) određene su protiv *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, u odsutnosti i prisutnosti inhibitora efluks pumpi CCCP, slika 39.

Dobiveni rezultati pokazali su da su ispitivani kvaterni amonijevi spojevi (QACs), uključujući QNH₂-C₁₄, QNH₂-C₁₆, QBn-C₁₂, QBn-C₁₄ i QBn-C₁₆, podložni efluksu, budući da je dodatak CCCP-a rezultirao smanjenjem njihovih MIK vrijednosti. Najizraženije smanjenje MIK-a uočeno je kod komercijalnih QACs te spoja QBn-C₁₆, što ukazuje na njihov veći afinitet za efluks pumpe. S obzirom na to da je stanična akumulacija sintetiziranih 3-amidokinuklidinijevih QACs dodatno ograničena zbog prisutnosti polarnog amida na okosnici kinuklidina, može se pretpostaviti da ispitani spojevi u manjoj mjeri potiču razvoj bakterijske rezistencije posredovane Qac efluks pumpama. Ovo je u skladu s prethodnim saznanjima prema kojima monoQACs strukture pokazuju veću sklonost indukciji rezistencije u usporedbi s poliQACs.¹⁴⁵

Posebno je uočeno da je QNH₂-C₁₆ imao izraženiji potencijal za poticanje rezistencije od svog analoga QNH₂-C₁₄, budući da je MIK u prisutnosti CCCP-a bio osam puta niži. S druge strane, kod QNH₂-C₁₄ smanjenje MIK-a bilo je dvostruko manje, što sugerira slabije prepoznavanje ovog spoja od strane bakterijskog sustava rezistencije. Ovi rezultati ukazuju na to da prepoznavanje QACs nije isključivo uvjetovano elektrostatskim interakcijama, već da značajnu ulogu ima i duljina alkilnog lanca, koja može utjecati na vezanje spojeva za aktivno mjesto efluks pumpe ili interakciju s transkripcijskim regulatorom QacR. Osim toga, veća toksičnost QNH₂-C₁₆ mogla bi inducirati brži adaptivni odgovor bakterijske stanice u svrhu preživljavanja pod selekcijskim pritiskom.

Dodatno, analiza prikazana na slici 39 pokazuje da kandidati kvaternih amonijevih spojeva derivata kinuklidin-3-ona nisu prepoznati od strane intrinzičnog bakterijskog sustava rezistencije te da ne predstavljaju supstrate za QacA/B efluks pumpe. Posljedično, vjerojatnost razvoja bakterijske rezistencije kod *S. aureus* ATCC 33591, koji nosi gene rezistencije, može se smatrati iznimno niskom.



Slika 39. Procijenjen potencijal za razvoj bakterijske rezistencije na monokvaterne amonijeve soli 3-suspsituiranog kinuklidina te na komercijalno dostupne kvaterne amonijeve spojeve, cetilpiridinijev klorid (CPC) i benzildodecildimetilamonijev bromid (BAB). Dobivene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) u Mueller–Hinton mediju (MH) prikazane su stupčastim graфом izraženim u μM , uz usporedbu s MIK vrijednostima dobivenim u prisutnosti karbonilcijanid 3-klorfenilhidrazona (CCCP), prikazanim linijom.

Tablica 7. Prikaz faktora smanjenja MIK vrijednosti u prisutnosti CCCP-a za monokvaternu amonijeve soli.

Kratica spoja	Smanjenje MIK-a
QNH ₂ -C ₁₄	2x
QNH ₂ -C ₁₆	8x
QBn-C ₁₂	4x
QBn-C ₁₄	4x
QBn-C ₁₆	16x
QO-C ₁₂	-
QO-C ₁₄	-
QO-C ₁₆	-
CPC	16x
BAB	32x

Također su ispitani i kandidati biskvaternih amonijevih spojeva (bisQACs), prikazani u tablici 8, pokazali su identične vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), što sugerira njihovu iznimnu stabilnost u prisutnosti bakterijskog intrinzičnog sustava rezistencije. Ova pojava implicira da bisQACs predstavljaju najslabije supstrate za Qac efluks pumpe, čime se značajno smanjuje mogućnost razvoja bakterijske rezistencije posredovane ovim mehanizmima.

Strukturna obilježja bisQACs mogu objasniti njihovu smanjenu podložnost efluks pumpama. U usporedbi s monokvaternim amonijevim spojevima (monoQACs), bisQACs posjeduju dva kvaterna dušikova centra, čime se povećava ukupni pozitivni naboj molekule. Ova povećana kationska priroda može smanjiti sposobnost pasivnog prolaska kroz bakterijske membrane i istovremeno ograničiti prepoznavanje spojeva od strane efluks pumpi, koje su često optimizirane za transport manjih i slabije nabijenih molekula. Nadalje, dvostruka kvaternizacija može smanjiti fleksibilnost molekule i njen afinitet za interakciju s aktivnim mjestima efluks pumpi, što dodatno objašnjava njihovu smanjenu osjetljivost na izbacivanje iz bakterijske stanice.

Osim strukturnih faktora, smanjena podložnost bisQACs efluks sustavu može se objasniti i mehanizmom njihovog djelovanja. Poznato je da kvaterna amonijevi spojevi primarno ostvaruju svoj

antimikrobni učinak destabilizacijom bakterijske membrane putem interakcija s negativno nabijenim lipidnim komponentama, poput fosfolipida i teikoičnih kiselina u staničnoj stijenci. Povećani pozitivan naboj bisQACs može rezultirati jačim vezanjem za bakterijsku membranu i povećanom membranskom permeabilizacijom, što dovodi do brže i efikasnije baktericidne aktivnosti. Brza membranska disrupcija smanjuje vrijeme izloženosti spojeva efluks sustavu, čime se dodatno ograničava mogućnost njihove aktivne eliminacije iz stanice.

Analiza učinka mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na razvoj bakterijske rezistencije ukazuje na jasnu razliku u njihovoj sposobnosti induciranja mehanizama otpornosti. Novosintetizirani monoQACs pokazali su osjetljivost na inhibiciju efluks pumpi, što implicira da djeluju kao supstrati za Qac efluks sustav reguliran transkripcijskim faktorom QacR. Ova interakcija omogućuje aktivaciju transkripcije gena uključenih u efluksne mehanizme, čime se povećava rizik od selekcije rezistentnih bakterijskih populacija.

Nasuprot tome, bisQACs pokazuju značajno smanjenu interakciju s efluks sustavom i regulatornim proteinima poput QacR. Njihova višestruka kvaternizacija, izražen pozitivan naboj i strukturna rigidnost ograničavaju intracelularnu akumulaciju te time onemogućuju učinkovito vezanje za QacR. Rezultat toga je izostanak aktivacije ekspresije gena za efluks pumpe, što potvrđuju stabilne minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i u prisutnosti inhibitora efluksa. Na taj način bisQACs smanjuju mogućnost razvoja i širenja otpornosti.

Ovi nalazi u potpunosti su u skladu s rezultatima istraživanja Wuestove i Minbioleove grupe, koji su pokazali da poli- i bisQACs, zbog svoje polikationske prirode i prostorne rigidnosti, ne induciraju QacR-posredovanu ekspresiju efluks pumpi. Njihova istraživanja dodatno su potvrdila da višestruka kvaternizacija ograničava interakciju spojeva s transkripcijskim regulatorima povezanim s ekspresijom otpornosti, čime se smanjuje selekcijski pritisak za pojavu rezistentnih bakterija.²²

Zaključno, iako monoQACs zadržavaju određeni antimikrobni potencijal, njihova sklonost poticanju efluksnih mehanizama čini ih manje pogodnima za dugoročnu primjenu. S druge strane, bisQACs predstavljaju iznimno obećavajuće kandidate za razvoj novih antimikrobnih sredstava s minimalnim rizikom od razvoja bakterijske otpornosti. Njihov specifičan mehanizam djelovanja, smanjena interakcija s efluks regulatornim sustavom te potkrijepljeni nalazi Wuestove grupe pružaju čvrst znanstveni temelj za njihovu daljnju optimizaciju u borbi protiv antimikrobne rezistencije.²¹

Tablica 8. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) određenih u Mueller-Hinton mediju, kao i MIC vrijednosti u prisutnosti inhibitora efluks pumpi, karbonil cijanid-3-klorfenilhidrazona (CCCP) za biskvaterne amonijeve soli.

MIK (μM)		
Kratika spoja	MIK	MIK + CCCP
2(QC ₁₂) ₃	75	75
2(QC ₁₄) ₃	75	75
2(QC ₁₆) ₃	19	19
2(QC ₁₄) ₄	75	75
2(QC ₁₆) ₄	9	9
2(QC ₁₂) ₆	19	19
2(QC ₁₄) ₆	19	19
2(QC ₁₆) ₆	5	5

4.3.5. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije bakterijskih biofilмова mono- i biskvaternih amonijevih spojeva

Bakterijski biofilm predstavlja visoko organiziranu zajednicu mikroorganizama ugrađenih u zaštitni ekstracelularni matriks, koji osigurava povećanu otpornost bakterija na antimikrobne agense i imunološke mehanizme domaćina. Bakterijski biofilmovi koloniziraju na biotičke i abiotičke površine, uključujući medicinske uređaje, zubne površine i kronične rane. Zbog njihove uloge u perzistentnim infekcijama i medicinski izazovnoj terapiji, ključno je razviti antibakterijske spojeve koji su učinkoviti ne samo protiv planktonskih bakterijskih stanica, već i protiv zrelih biofilмова, kako bi se povećala efikasnost liječenja i smanjila mogućnost razvoja antibiotske rezistencije. Sposobnost formiranja biofilma jedan je od ključnih čimbenika perzistencije bakterijskih patogena u kliničkim i ekološkim uvjetima, čineći ih odgovornima za razvoj kroničnih infekcija i smanjenje učinkovitosti konvencionalnih antimikrobnih tretmana. Stoga je razumijevanje dinamike formiranja biofilma, njegove građe i mehanizama rezistencije ključno za razvoj inovativnih strategija eradikacije i prevencije biofilmom posredovanih infekcija.¹⁴⁶

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je mogućnost novo sintetiziranih monokvaternih i

biskvaternih amonijevih spojeva 3-supstituiranog kinuklidina na mogućnost inhibicije bakterijskog biofilma na dvjema različitim Gram-pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 te *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, slika 40 i slika 41.

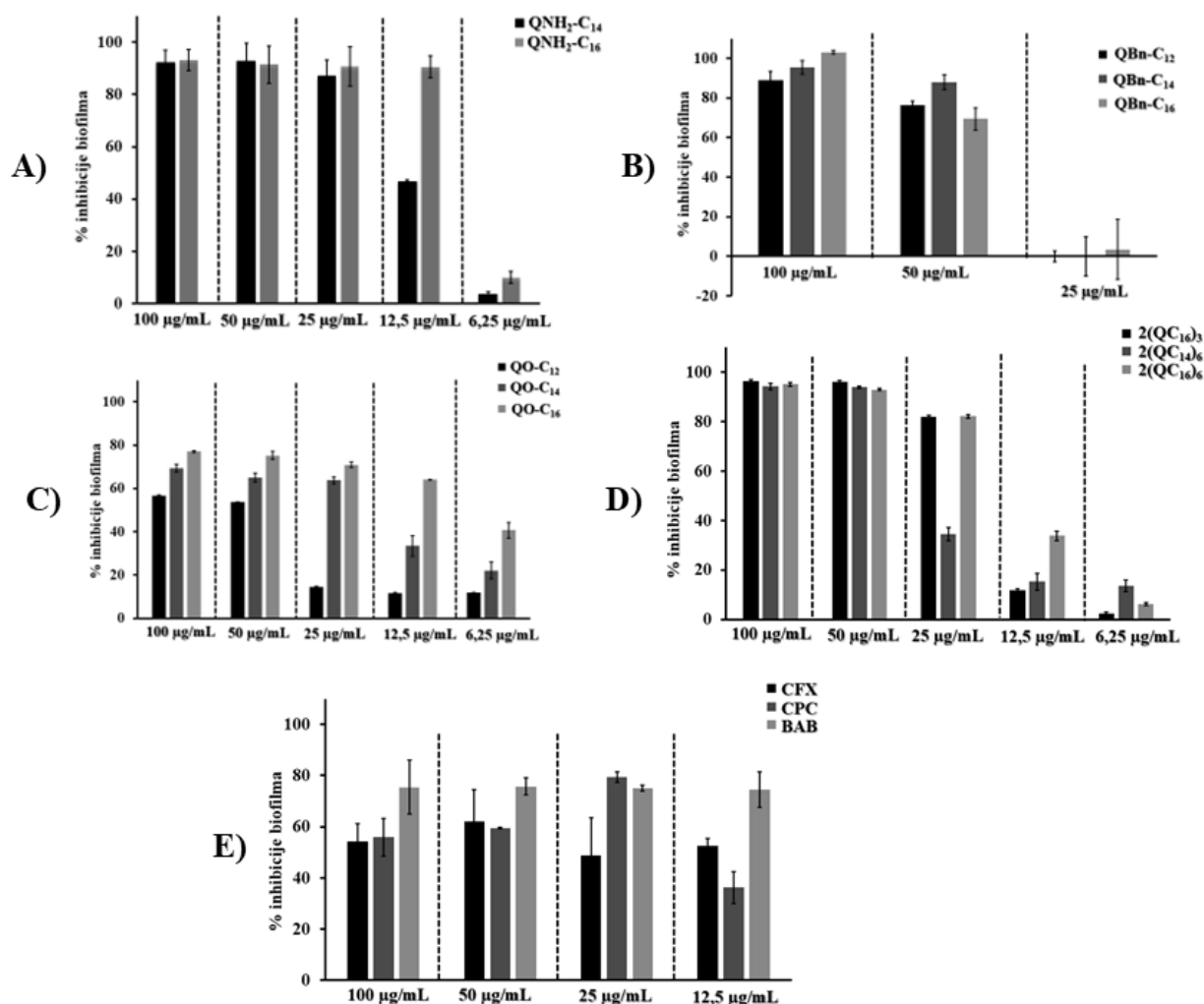
Ovo istraživanje pruža ključne spoznaje o potencijalu kationskih amfifilnih QACs kao inhibirajućih biofilmskih agenasa protiv *S. aureusa* i *L. monocytogenes*, što bi moglo unaprijediti strategije liječenja i prevencije perzistentnih infekcija povezanih s biofilmovima. S obzirom na izazove koje predstavljaju infekcije biofilmovima, posebice u imunokompromitiranih bolesnika, razvoj novih agenasa usmjerenih na razgradnju biofilma mogao bi imati značajne kliničke implikacije. Daljnja istraživanja mehanizama djelovanja ovih spojeva, kao i njihova klinička učinkovitost i sigurnost, nužni su koraci za njihovu moguću integraciju u kliničku praksu.

Određivanje MBIC prema bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Staphylococcus aureus ATCC 25923 koji uzrokuje oportunističke infekcije različitih tkiva kod ljudi, a posebno meticilin-rezistentni sojevi (MRSA), jedan je od vodećih uzročnika nozokomijalnih infekcija, pri čemu njegova otpornost na gotovo sve dostupne β -laktamske antibiotike, kao i na druge klase antimikrobnih sredstava, predstavlja ozbiljan klinički izazov.^{30,31} Mehanizmi rezistencije ovog patogena, uključujući modificirane penicilin-vezujuće proteine (PBP2a), aktivne efluksne pumpe i sposobnost formiranja biofilma, dodatno smanjuju učinkovitost konvencionalnih antimikrobnih terapija.¹⁴⁷

Prethodna istraživanja pokazala su da kvaterni amonijevi spojevi (QACs) mogu učinkovito inhibirati stvaranje biofilma *S. aureusa* pri koncentracijama nižim od minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).⁴² Ovaj učinak može se pripisati njihovoj sposobnosti destabilizacije bakterijske membrane i ometanja ranih stadija biofilmogeneze. Nadalje, rezultati istraživanja ukazuju na mogućnost da određeni QACs djeluju sinergijski s drugim antimikrobnim reagensima, čime bi se mogla poboljšati terapijska učinkovitost protiv MRSA infekcija i pridonijeti smanjenju razvoja daljnje antimikrobne rezistencije.¹⁴⁸

Potencijal za inhibiciju stvaranja biofilma *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 određen je za odabrane kandidate monokvaternih i biskvaternih amonijevih spojeva kao i za komercijalno dostupni antibiotik cefotaksim te komercijalno dostupne QACs, CPC i BAB.



Slika 40. Inhibicija biofilma bakterijskog soja *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ispitana je nakon tretmana sljedećim skupinama kandidatskih spojeva: **(A)** QNH₂-QACs, **(B)** QBn-QACs, **(C)** QO-QACs, **(D)** bisQACs te **(E)** komercijalnim antimikrobnim reagensima. Postotak inhibicije biofilma za sve ispitivane spojeve kvantificiran je pri različitim koncentracijama, a rezultati su uspoređeni s netretiranom kontrolnom skupinom. Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, izračunata iz najmanje triju neovisnih eksperimenata, pri čemu je svaki eksperiment proveden u trostrukim ponavljanjima.

Kao što je prikazano na slici 40 (A), QNH₂-C₁₄ pokazao je visoku aktivnost inhibiranja biofilma pri najvišim koncentracijama, s 92 % inhibicije biofilma pri 100 µg/mL te sličnom učinkovitosti pri 50 µg/mL. Pri 25 µg/mL učinkovitost lagano opada na 87 %, dok se pri 12,5 µg/mL bilježi značajniji pad inhibicije na 46 %. Najniža testirana koncentracija (6,25 µg/mL) rezultirala je izrazito slabom inhibicijom biofilma od samo 3 %, što ukazuje na značajan gubitak aktivnosti inhibicije biofilma pri

niskim koncentracijama.

QNH₂-C₁₆, s druge strane, pokazao je dosljedno visoku inhibicijsku učinkovitost u širokom rasponu koncentracija. Pri 100 µg/mL postignuta je inhibicija od 93 %, dok je pri 50 µg/mL zabilježena neznatno niža vrijednost od 91 %. Ovaj spoj zadržava svoju visoku učinkovitost i pri 25 µg/mL (90 %), a pri 12,5 µg/mL i dalje pokazuje snažan antibiofilmski učinak. Međutim, pri 6,25 µg/mL inhibicija naglo pada na 10 %, što ukazuje na osjetno smanjenje učinkovitosti pri nižim koncentracijama. Zbog veće površinske aktivnosti spoja QNH₂-C₁₆, očekivano je da će učinkovitije inhibirati tvorbu biofilma. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da oba spoja, QNH₂-C₁₄ i QNH₂-C₁₆, zaslužuju daljnju pažnju zbog svoje iznimne aktivnosti inhibiranja biofilma.

Slika 40 (B) prikazuje seriju antibakterijskih reagensa iz skupine 3-benzamidokinuklidina. Pri najvišoj testiranoj koncentraciji (100 µg/mL), QBn-C₁₂ pokazao je značajnu inhibiciju biofilma od 89 %, dok se pri 50 µg/mL bilježi pad učinkovitosti na 76 %. Pri 25 µg/mL antibiofilmski učinak je potpuno izgubljen što sugerira da je ovaj spoj učinkovit samo pri višim koncentracijama.

QBn-C₁₄ pokazao je još višu inhibicijsku sposobnost u odnosu na QBn-C₁₂. Pri 100 µg/mL postignuta je inhibicija od 95 %, dok je pri 50 µg/mL i dalje zadržana visoka učinkovitost od 87 %. Međutim, pri 25 µg/mL, slično kao i kod QBn-C₁₂, dolazi do potpunog gubitka antibiofilmskog učinka. Ovi rezultati sugeriraju da je QBn-C₁₄ snažniji inhibitor biofilma u usporedbi s QBn-C₁₂, ali njegova učinkovitost također ovisi o koncentraciji.

Zanimljivo, QBn-C₁₆ pokazuje najvišu inhibiciju biofilma pri 100 µg/mL. Pri 50 µg/mL inhibicija pada na > 60 %, a pri 25 µg/mL, za razliku od QBn-C₁₂ i QBn-C₁₄, očuvana je djelomična inhibicija biofilma što sugerira nešto bolju učinkovitost na nižim koncentracijama.

Rezultati pokazuju da su QBn-C₁₄ i QBn-C₁₆ najučinkovitiji inhibitori biofilma pri višim koncentracijama, dok QBn-C₁₂ pokazuje slabiju aktivnost. Sva tri spoja gube učinak prema biofilmovima pri 25 µg/mL, s izuzetkom QBn-C₁₆, koji zadržava minimalnu aktivnost. Ovi podaci sugeriraju da QBn-C₁₆ ima najpotentniji učinak prema bakterijskim biofilmovima, dok je QBn-C₁₄ također vrlo učinkovit, ali ne i pri nižim koncentracijama.

Slika 40 (C) prikazuje aktivnost inhibicije biofilma monokvaternih amonijevih spojeva derivata kinuklidin-3-ona. Ketonski derivat s 12 ugljikovih atoma (QO-C₁₂) pokazuje relativno nisku aktivnost inhibicije biofilma, s maksimalnom inhibicijom > 50 % pri 100 µg/mL. Smanjenje koncentracije na 50 µg/mL dovodi do blažeg pada inhibicije dok pri 25 µg/mL dolazi do značajnog gubitka aktivnosti (14 %). Pri još nižim koncentracijama (12,5 i 6,25 µg/mL), inhibicija se stabilizira na oko 11 %, što upućuje na vrlo ograničenu učinkovitost pri nižim dozama.

Suprotno tome, QO-C₁₄ pokazuje bolju antibiofilmsku učinkovitost u odnosu na QO-C₁₂. Pri 100 µg/mL postiže se inhibicija od > 65 % dok pri 50 µg/mL inhibicija ostaje i dalje visoka. Ovaj spoj pokazuje i dobar učinak pri 25 µg/mL (63 %), što sugerira veću postojanost djelovanja u usporedbi s QO-C₁₂. Međutim, pri 12,5 µg/mL dolazi do značajnog smanjenja inhibicije (> 30 %), dok je pri 6,25 µg/mL aktivnost još niža (> 20 %).

Među kvaternim solima ketonskih derivata kinuklidina, QO-C₁₆ pokazuje najbolju aktivnost prema biofilmovima. Pri najvišoj koncentraciji (100 µg/mL), inhibicija doseže 77 %, dok se pri 50 µg/mL bilježi neznatan pad na 75 %. Pri 25 µg/mL inhibicija i dalje ostaje visoka (> 70 %), što ukazuje na značajno stabilno djelovanje ovog spoja. Pri nižim koncentracijama (12,5 i 6,25 µg/mL) dolazi do postupnog smanjenja inhibicije na 64 % odnosno 40 %.

Slika 40 (D) prikazuje ispitanu aktivnost inhibicije biofilma biskvaternih amonijevih spojeva koji se razlikuju po duljini ugljikovodičnog lanca i duljini poveznica. Spoj 2(QC₁₆)₃ pokazuje vrlo visoku aktivnost inhibicije biofilma pri najvišim koncentracijama. Pri 100 µg/mL, inhibicija doseže > 90 %, a pri 50 µg/mL ostaje gotovo jednaka. Međutim, pri 25 µg/mL dolazi do blagog pada aktivnosti (> 80 %), dok pri 12,5 µg/mL inhibicija opada na 11 %. Pri najnižoj koncentraciji (6,25 µg/mL), učinkovitost je zanemariva (> 2%), što ukazuje na ograničen doseg pri nižim koncentracijama.

Spoj 2(QC₁₄)₆ također pokazuje snažnu aktivnost inhibicije biofilma pri višim koncentracijama. Pri 100 µg/mL, inhibicija iznosi > 90 %, dok pri 50 µg/mL i dalje ostaje visoka. Međutim, uočava se nagli pad učinkovitosti na 34 % pri 25 µg/mL, dok su pri nižim koncentracijama (12,5 i 6,25 µg/mL) postoci inhibicije 15 % odnosno 13 %, što ukazuje na gubitak aktivnosti pri nižim koncentracijama.

Derivat 2(QC₁₆)₆ pokazuje najstabilniju inhibiciju biofilma među testiranim spojevima. Pri 100 µg/mL, inhibicija je 95 %, dok pri 50 µg/mL ostaje visoka (> 90 %). Pri 25 µg/mL inhibicija je > 80 %, što ukazuje na bolju stabilnost u odnosu na 2(QC₁₄)₆. Međutim, pri 12,5 µg/mL inhibicija pada na > 30 %, dok pri 6,25 µg/mL iznosi svega 6 %, što ukazuje na smanjenu aktivnost pri nižim koncentracijama.

Slika 40 (E) prikazuje određeni postotak inhibicije biofilma u prisutnosti antibiotika cefotaksima (CFX) i dva komercijalna QACs, cetilpiridinijevog klorida (CPC) i benzalkonijevog bromida (BAB). Dobiveni rezultati prikazani na slici ukazuju na varijabilnu učinkovitost ispitivanih spojeva (CFX, CPC i BAB) ovisno o koncentraciji. Najveću inhibiciju stvaranja biofilma u svim ispitivanim uvjetima pokazao je spoj BAB, pri čemu je inhibicija ostala konzistentno visoka (>74%) neovisno o koncentraciji. Nasuprot tome, spoj CPC pokazao je izraženu koncentracijski ovisnu aktivnost, s maksimalnom inhibicijom pri 25 µg/mL (> 70 %), dok je pri najnižoj testiranoj koncentraciji (12,5

µg/mL) zabilježena značajna redukcija učinkovitosti (> 30 %). Spoj CFX pokazao je umjerenu aktivnost, s najvišom inhibicijom pri 50 µg/mL (62 %), no nije pokazao značajno inhibirajuće djelovanje pri nižim koncentracijama.

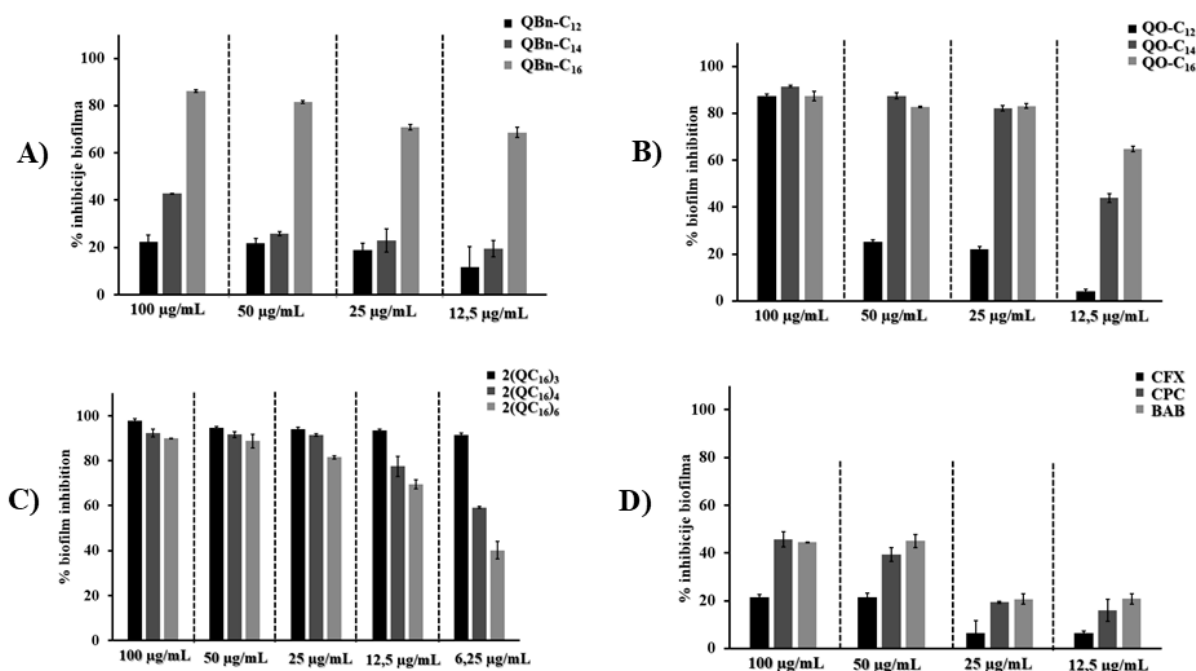
Određivanje MBIC prema bakteriji *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Isto tako, ispitan je i potencijal za inhibiciju stvaranja biofilma *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 te je određen za odabrane kandidate monokvaternih i biskvaternih amonijevih spojeva kao i za komercijalne antimikrobne reagense (CFX, CPC i BAB).

Listeria monocytogenes je Gram-pozitivna bakterija i značajan uzročnik listerioze, ozbiljne alimentarne infekcije koja osobito ugrožava osjetljive populacije, uključujući novorođenčad, starije osobe, trudnice i imunokompromitirane pojedince, poput primatelja transplantiranih organa.¹⁴⁹ Ova patogena bakterija poznata je po svojoj sposobnosti stvaranja biofilma, što predstavlja ključni čimbenik njezine perzistencije u različitim okruženjima te rezistencije na imunološke obrambene mehanizme i antibiotske tretmane. Posljedično, infekcije uzrokovane *L. monocytogenes* postaju izrazito teško izlječive. U kliničkom kontekstu, infekcije izazvane *L. monocytogenes* osobito su zabrinjavajuće kod imunokompromitiranih bolesnika, što potvrđuje dokumentirani slučaj diseminirane nozokomijalne infekcije kod žene tri mjeseca nakon transplantacije pluća.^{150,151} Ovaj primjer ilustrira stalnu prijetnju koju predstavlja *L. monocytogenes*, osobito u dugotrajnim hospitalizacijama i postoperativnoj skrbi, gdje patogen može iskoristiti kompromitirano imunološko stanje pacijenata.

Pretpostavlja se da perzistentan pozitivni naboj kationskih amfifila može olakšati interakciju s negativno nabijenim komponentama izvanstaničnog polimernog matriksa biofilma, čime se može poboljšati prodiranje spojeva u dublje slojeve biofilma i potencijalno povećati unos antimikrobnog reagensa u bakterijske stanice.¹⁵² Ova svojstva su od posebnog interesa za razvoj novih antibiofilmih strategija, budući da biofilm djeluje kao fizička i kemijska barijera koja smanjuje osjetljivost bakterija na konvencionalne antimikrobne reagense i imunosne obrambene mehanizme domaćina.

Antibiofilmska aktivnost određena je pri pet različitih koncentracijs (6,25, 12,5, 25, 50 i 100 µg/mL), iskazana kao postotak (%) inhibiranog bakterijskog biofilma i uspoređena s učinkom dvaju komercijalnih QACs, benzildimetildodecilamonijev bromidom (BAB) i cetilpiridinijevim kloridom (CPC), uključujući cefotaksim (beta-laktamski antibiotik). Cilj istraživanja bio je procijeniti potencijal monokvaternih i biskvaternih amonijevih spojeva u smanjenju formiranja biofilma i povećanju antimikrobne učinkovitosti.



Slika 41. Inhibicija biofilma bakterijskog soja *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ispitana je nakon tretmana sljedećim skupinama kvaternih amonijevih spojeva: (A) QBn-QACs, (B) QO-QACs, (C) bisQACs te (D) komercijalnim antimikrobnim reagensima. Postotak inhibicije biofilma za sve ispitivane spojeve kvantificiran je pri različitim koncentracijama, a rezultati su uspoređeni s netretiranom kontrolnom skupinom. Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija, izračunata iz najmanje triju neovisnih eksperimenata, pri čemu je svaki eksperiment proveden u trostrukim ponavljanjima.

Na slici 41 (A) prikazana je sposobnost triju monokvaternih amonijevih spojeva 3-benzamidokinuklidina (QBn-C₁₂, QBn-C₁₄ i QBn-C₁₆) da inhibiraju formiranje bakterijskog biofilma *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 pri različitim koncentracijama (100, 50, 25 i 12,5 µg/mL). Dobiveni podaci ukazuju na značajne razlike u učinkovitosti među ispitivanim spojevima. QBn-C₁₆ pokazao je najsnažniji učinak inhibicije biofilma pri svim koncentracijama, s postotkom inhibicije od 86 % pri 100 µg/mL, dok je pri najnižoj testiranoj koncentraciji (12,5 µg/mL) inhibicija i dalje bila značajna (> 60 %). Ovi rezultati ukazuju na potencijal QBn-C₁₆ kao snažnog inhibirajućeg reagensa biofilma, vjerojatno zbog njegove veće hidrofobnosti, koja omogućuje bolju penetraciju u biofilm i učinkovitije interakcije s bakterijskom membranom. S druge strane, QBn-C₁₄ je pokazao umjerenu inhibiciju biofilma, pri čemu je maksimalna inhibicija zabilježena pri 100 µg/mL (> 40 %), dok je pri najnižoj koncentraciji (12,5 µg/mL) inhibicija pala na 19 %.

Ovi rezultati sugeriraju da duljina alkilnog lanca utječe na aktivnost inhibicije biofilma, pri čemu je QBn-C₁₄ manje učinkovit od QBn-C₁₆, ali značajno potentniji od QBn-C₁₂. Najslabiji učinak zabilježen je kod QBn-C₁₂, čija je maksimalna inhibicija pri 100 µg/mL iznosila 22 %, dok je pri 12,5 µg/mL pala na samo 11 %. Ovi rezultati upućuju na to da kraći alkilni lanci ne omogućuju dovoljnu hidrofobnu interakciju s bakterijskim biofilmom, smanjujući time ukupnu učinkovitost spoja. S obzirom na dobivene rezultate, može se zaključiti kako se povećanjem hidrofobnosti može optimizirati djelovanje antimikrobnih reagensa kao na primjeru QBn-C₁₆ koji je pokazao superiornu aktivnost u odnosu na QBn-C₁₂ i QBn-C₁₄. Ovi rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja mehanizama djelovanja QACs u inhibiciji bakterijskih biofilмова i njihovu moguću primjenu u antimikrobnoj terapiji protiv *L. monocytogenes*.

Na slici 41 (B) prikazana je aktivnost inhibicije biofilma kvaternih amonijevih spojeva ketonski derivata. QO-C₁₄ pokazao je najvišu učinkovitost inhibiranja biofilma, pri čemu je pri 100 µg/mL postignuta gotovo potpuna inhibicija biofilma (> 90 %). Također, ovaj spoj je zadržao visoku inhibiciju i pri nižim koncentracijama – 87 % pri 50 µg/mL i 82 % pri 25 µg/mL. Međutim, pri 12,5 µg/mL inhibicija značajno opada (> 40 %), dok je pri 6,25 µg/mL zabilježena vrlo niska inhibicija (8 %). Ovi rezultati sugeriraju da je QO-C₁₄ najpotentniji među ispitivanim ketonskim derivatima, osobito pri višim koncentracijama. S druge strane, QO-C₁₆ također je pokazao snažnu aktivnost inhibicije biofilma, s 87 % inhibicije pri 100 µg/mL, što je usporedivo s QO-C₁₄. Pri 50 i 25 µg/mL postignute su visoke razine inhibicije (82 % i 83 %), što ukazuje na stabilnu učinkovitost ovog spoja u širem rasponu koncentracija. Pri nižim koncentracijama, inhibicija je bila umjerena (64 % pri 12,5 µg/mL i 45 % pri 6,25 µg/mL), što ukazuje na njegovu relativno bolju aktivnost u usporedbi s QO-C₁₄ na niskim koncentracijama. Nasuprot tome, QO-C₁₂ pokazao je najslabiju aktivnost inhibicije biofilma. Iako je pri 100 µg/mL zabilježena inhibicija od 87 %, pri 50 µg/mL dolazi do pada učinkovitosti (> 20 %), dok su pri još nižim koncentracijama zabilježene vrlo niske vrijednosti inhibicije (22 % pri 25 µg/mL, 4 % pri 12,5 µg/mL i samo 0,7 % pri 6,25 µg/mL). Ovi podaci sugeriraju da QO-C₁₂ nije dovoljno učinkovit pri nižim koncentracijama i da njegova aktivnost inhibicije biofilma značajno ovisi o koncentraciji.

Slika 41 (C) prikazuje biskvaterne derivate, gdje je spoj 2(QC₁₆)₃ pokazao najvišu aktivnost inhibicije biofilma, pri čemu je već pri 100 µg/mL postignuta gotovo potpuna inhibicija biofilma (97 %). Učinkovitost ovog spoja ostala je vrlo visoka i pri nižim koncentracijama – 94 % pri 50 µg/mL, 94 % pri 25 µg/mL i 93 % pri 12,5 µg/mL. Čak i pri najnižoj testiranoj koncentraciji (6,25 µg/mL), inhibicija biofilma iznosila je 91 %, što upućuje na izuzetnu učinkovitost ovog spoja u

suzbijanju formiranja biofilma. S druge strane, $2(QC_{16})_4$ također je pokazao visoku aktivnost inhibicije biofilma, iako nešto slabiju od $2(QC_{16})_3$. Pri 100 $\mu\text{g/mL}$ zabilježena je inhibicija od 92 %, dok je pri 50 i 25 $\mu\text{g/mL}$ učinkovitost ostala visoka (> 90 %). Međutim, pri 12,5 $\mu\text{g/mL}$ dolazi do pada inhibicije (> 70 %), dok je pri 6,25 $\mu\text{g/mL}$ postignuta inhibicija od > 50 %, što je značajno niže od vrijednosti zabilježenih kod $2(QC_{16})_3$. Najslabiji učinak među ispitivanim spojevima pokazao je $2(QC_{16})_6$. Iako je pri 100 $\mu\text{g/mL}$ inhibicija bila relativno visoka (89 %), pri nižim koncentracijama zabilježen je kontinuirani pad učinkovitosti – 88 % pri 50 $\mu\text{g/mL}$, 81 % pri 25 $\mu\text{g/mL}$, te 69 % pri 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Pri najnižoj testiranoj koncentraciji (6,25 $\mu\text{g/mL}$), inhibicija biofilma pala je na 40 %, što ukazuje na slabiju učinkovitost ovog spoja pri niskim dozama. Rezultati pokazuju da su svi ispitani biskvaterni derivati imali značajan inhibicijski učinak na biofilm *L. monocytogenes* ATCC 7644, pri čemu je $2(QC_{16})_3$ bio najučinkovitiji u cijelom testiranom rasponu koncentracija. Ovaj spoj zadržava visoku inhibicijsku aktivnost čak i pri niskim koncentracijama, što ga čini posebno zanimljivim za daljnja istraživanja. Nasuprot tome, $2(QC_{16})_4$ i $2(QC_{16})_6$ pokazuju smanjenje učinkovitosti pri nižim koncentracijama, pri čemu je $2(QC_{16})_6$ najmanje učinkovit od svih ispitivanih spojeva. Ovi rezultati sugeriraju da strukturne modifikacije biskvaternih derivata mogu značajno utjecati na njihovu učinkovitost u inhibiciji bakterijskih biofilma, te da bi daljnje istraživanje mehanizama djelovanja ovih spojeva moglo doprinijeti razvoju novih učinkovitih terapijskih strategija.

Slika 41 (D) prikazuje vrijednosti postotka inhibiranosti biofilma za komercijalno dostupne antimikrobne agense, cefotaksim (beta-laktamski antibiotik), CPC (cetilpiridinijev klorid) i BAB (benzildimetildodecilamonijev bromid). Cefotaksim pokazuje nisku do umjerenu inhibiciju biofilma. Pri 100 i 50 $\mu\text{g/mL}$, inhibicija biofilma iznosi > 20 %, što upućuje na blagi učinak pri višim koncentracijama, ali bez značajnog povećanja efikasnosti pri smanjenju doze. Pri 25 $\mu\text{g/mL}$, inhibicija opada na 6 %, dok je pri 12,5 $\mu\text{g/mL}$ gotovo jednaka, što ukazuje na ograničenu aktivnost ovog beta-laktamskog antibiotika. CPC pokazuje znatno veću aktivnost inhibicije biofilma u odnosu na cefotaksim, osobito pri višim koncentracijama. Pri 100 $\mu\text{g/mL}$, inhibicija doseže 45 %, dok pri 50 $\mu\text{g/mL}$ iznosi 39 %, što ukazuje na stabilan inhibicijski učinak pri višim koncentracijama. Međutim, pri 25 $\mu\text{g/mL}$, inhibicija opada na 19 %, a pri 12,5 $\mu\text{g/mL}$ dodatno se smanjuje na 15 %, što ukazuje na smanjenu učinkovitost pri nižim dozama. BAB pokazuje sličnu aktivnost kao CPC, ali uz nešto stabilniji učinak pri srednjim koncentracijama. Pri 100 $\mu\text{g/mL}$, inhibicija iznosi 44 %, dok pri 50 $\mu\text{g/mL}$ zadržava sličnu aktivnost, što ukazuje na dobru učinkovitost ovog spoja. Pri 25 $\mu\text{g/mL}$, inhibicija iznosi 20 %, a pri 12,5 $\mu\text{g/mL}$ ta vrijednost i

dalje ostaje slična, što ukazuje na bolju aktivnost pri nižim koncentracijama u usporedbi s CPC-om.

4.3.6. Određivanje viabilnosti stanica u vremenu klasičnom metodom nasijavanja i prebrojavanja tretiranih stanica

Jedna od ključnih metoda za procjenu djelovanja antimikrobnih reagensa jest određivanje viabilnosti tretirane mikrobne populacije tijekom definiranog vremenskog intervala inkubacije. Spojevi s izraženim antimikrobnim učinkom mogu se klasificirati prema njihovom mehanizmu djelovanja kao baktericidni ili bakteriostatski agensi. Baktericidni spojevi uzrokuju smanjenje broja živih stanica za $\geq 99,99\%$ unutar 24 sata tretmana, što odgovara redukciji $\geq 3 \log_{10}$ CFU/mL.¹⁵³ Nasuprot tome, bakteriostatski spojevi inhibiraju rast i diobu bakterijskih stanica, ali ne uzrokuju njihovu potpunu eradikaciju, odnosno bakteriostatski mehanizam djelovanja podrazumijeva zadržavanje bakterijske populacije u fazi stacionarnog rasta bez izravnog izazivanja stanične smrti.¹⁵⁴ Zbog izražene membranolitičke aktivnosti, kvaterni amonijevi spojevi (QACs) primarno se klasificiraju kao baktericidni agensi, pri čemu induciraju rapidnu destabilizaciju stanične membrane, što rezultira ireverzibilnim oštećenjem i litičkom staničnom smrću. Iako određene QACs pokazuju sposobnost intracelularnog transporta, nakon čega mogu interagirati s ključnim biomolekulama poput DNA ili proteina, molekularni mehanizmi takvog antibakterijskog djelovanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni te zahtijevaju dodatna istraživanja.^{155,156}

Eksperimentalno određivanje viabilnosti temelji se na serijskom razrjeđivanju i nasijavanju tretiranih uzoraka na nutritivne podloge, nakon čega slijedi inkubacija i prebrojavanje kolonija koje predstavljaju žive stanice. Dobiveni podaci izražavaju se kao logaritamska vrijednost broja jedinica koje formiraju kolonije po mililitru uzorka ($\log_{10}$ CFU/mL) u odnosu na trajanje inkubacije. Kvantifikacija promjena u populacijskoj brojnosti omogućuje preciznu procjenu dinamike mikrobne inaktivacije i razlikovanje između baktericidnog i bakteriostatskog učinka ispitivanog spoja.

Rezultati istraživanja ukazuju na izraženo baktericidno djelovanje kvaternih amonijevih spojeva derivata 3-aminokinuklidina, QNH₂-C₁₄ i QNH₂-C₁₆, pri čemu se unutar 4 sata tretmana bilježi značajno smanjenje broja živih bakterijskih stanica ($\log_{10}$ CFU/mL), slika 42. Osobito se ističe QNH₂-C₁₆, koji pokazuje najviši stupanj učinkovitosti, uz redukciju bakterijske populacije za više

od 90%, što sugerira snažan potencijal eliminacije bakterijskih stanica unutar relativno kratkog vremenskog intervala.

Krivulje vijabilnosti ($\log_{10}$ CFU/mL) prikazuju progresivno smanjenje broja preživjelih bakterija u prisutnosti oba spoja, pri čemu QNH₂-C₁₆ inducira bržu i intenzivniju redukciju bakterijske populacije u usporedbi s QNH₂-C₁₄. Tijekom inicijalnih 100–150 minuta tretmana dolazi do naglog pada broja bakterijskih stanica, dok je nakon 240 minuta vijabilnost reducirana na minimalne vrijednosti. Ovi podaci potvrđuju izraženu baktericidnu aktivnost QNH₂-C₁₆, dok QNH₂-C₁₄ pokazuje nešto sporiju kinetiku ubijanja, ali unatoč tome postiže značajnu inhibiciju rasta i smanjenje vijabilnosti bakterijskih stanica.

Pri dvostrukoj minimalnoj inhibitornoj koncentraciji ($2 \times \text{MIK}$), oba spoja demonstriraju izrazito snažan baktericidni učinak, s brzim padom $\log_{10}$ CFU/mL vrijednosti već unutar prvih 100 minuta tretmana. U slučaju QNH₂-C₁₆, vijabilnost bakterijskih stanica opada eksponencijalno te nakon 200–250 minuta dolazi do gotovo potpune eradikacije populacije, što ukazuje na njegov visok baktericidni potencijal. Nasuprot tome, QNH₂-C₁₄ također pokazuje značajan baktericidni učinak pri $2 \times \text{MIK}$, iako se redukcija broja stanica odvija sporijom dinamikom, uz prisutnost rezidualne populacije nakon završetka eksperimenta.

Ovi rezultati jasno upućuju na superiornu baktericidnu aktivnost QNH₂-C₁₆, osobito pri višim koncentracijama, dok QNH₂-C₁₄ također posjeduje baktericidna svojstva, ali s nižom brzinom eliminacije bakterija. Kinetika smanjenja $\log_{10}$ CFU/mL vrijednosti ukazuje na koncentracijsku ovisnost učinkovitosti ovih spojeva, pri čemu povećanje koncentracije korelira s bržom i potpunijom redukcijom bakterijske populacije.

U istraživanju antibakterijske aktivnosti kvaternih amonijevih spojeva (QACs) 3-benzamidokinuklidina, ispitana je dinamika rasta bakterijske populacije pri različitim koncentracijama testiranih spojeva. Rezultati su pokazali da QBn-C₁₄ pri $\frac{1}{2}$ MIK djeluje primarno supresivno na bakterijski rast, tijekom promatranog vremenskog intervala. Nasuprot tome, QBn-C₁₆ pri istoj koncentraciji isprva ne pokazuje značajnu inhibiciju, no već nakon 10. minute eksperimenta uočava se blagi pad bakterijske populacije. Nakon 30 minuta dolazi do progresivnog smanjenja broja živih stanica, dok je nakon 50 minuta zabilježena potpuna eradikacija bakterijske populacije.

Krivulje rasta pri MIK vrijednostima benziliranih derivata ukazuju na to da njihova antimikrobna aktivnost uključuje baktericidni mehanizam djelovanja, usporediv s onim koji je prethodno opisan

za QACs 3-aminokinuklidina. Ovi rezultati potvrđuju da su benzilirani derivati kinuklidinijevih spojeva učinkoviti antibakterijski agensi te da njihova aktivnost ovisi o strukturi i duljini alkilnog lanca, pri čemu QBn-C₁₆ pokazuje brži baktericidni efekt u usporedbi s QBn-C₁₄.

Pri $2 \times \text{MIK}$ vrijednostima, oba testirana spoja, QBn-C₁₄ i QBn-C₁₆, induciraju potpunu inhibiciju bakterijskog rasta već nakon 10 minuta, što ukazuje na snažan baktericidni učinak pri višim koncentracijama.

Kinetike inhibicija za kvaterne amonijeve spojeve kinuklidin-3-ona, QO-C₁₄ i QO-C₁₆, ukazuju na značajno poboljšanu antimikrobnu učinkovitost spoja QO-C₁₆ u svim analiziranim vremenskim intervalima. Konkretno, QO-C₁₆ postiže >99,99 % redukcije populacije *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 već nakon 2 sata izloženosti pri MIK koncentraciji, potvrđujući snažan baktericidni učinak. Pri $2 \times \text{MIK}$ koncentraciji, QO-C₁₆ uzrokuje potpunu eradikaciju bakterijske populacije unutar 30 minuta, što ukazuje na izrazito brzi i učinkoviti antimikrobni mehanizam djelovanja.

Nasuprot tome, QO-C₁₄ pokazuje značajno sporiju kinetiku baktericidnog učinka, pri čemu je potreban dulji vremenski period kako bi se postigla usporediva razina eradikacije bakterija. Ova razlika u kinetici baktericidnog djelovanja sugerira moguće varijacije u propusnosti membrane, interakcijama s bakterijskim ciljevima ili intracelularnoj retenciji između ispitivanih spojeva. Uočene razlike između QO-C₁₄ i QO-C₁₆ dodatno potvrđuju utjecaj duljine alkilnog lanca na antimikrobnu aktivnost, pri čemu dulji alkilni supstituenti poboljšavaju disrupciju bakterijske membrane te posljedično ubrzavaju baktericidni učinak.

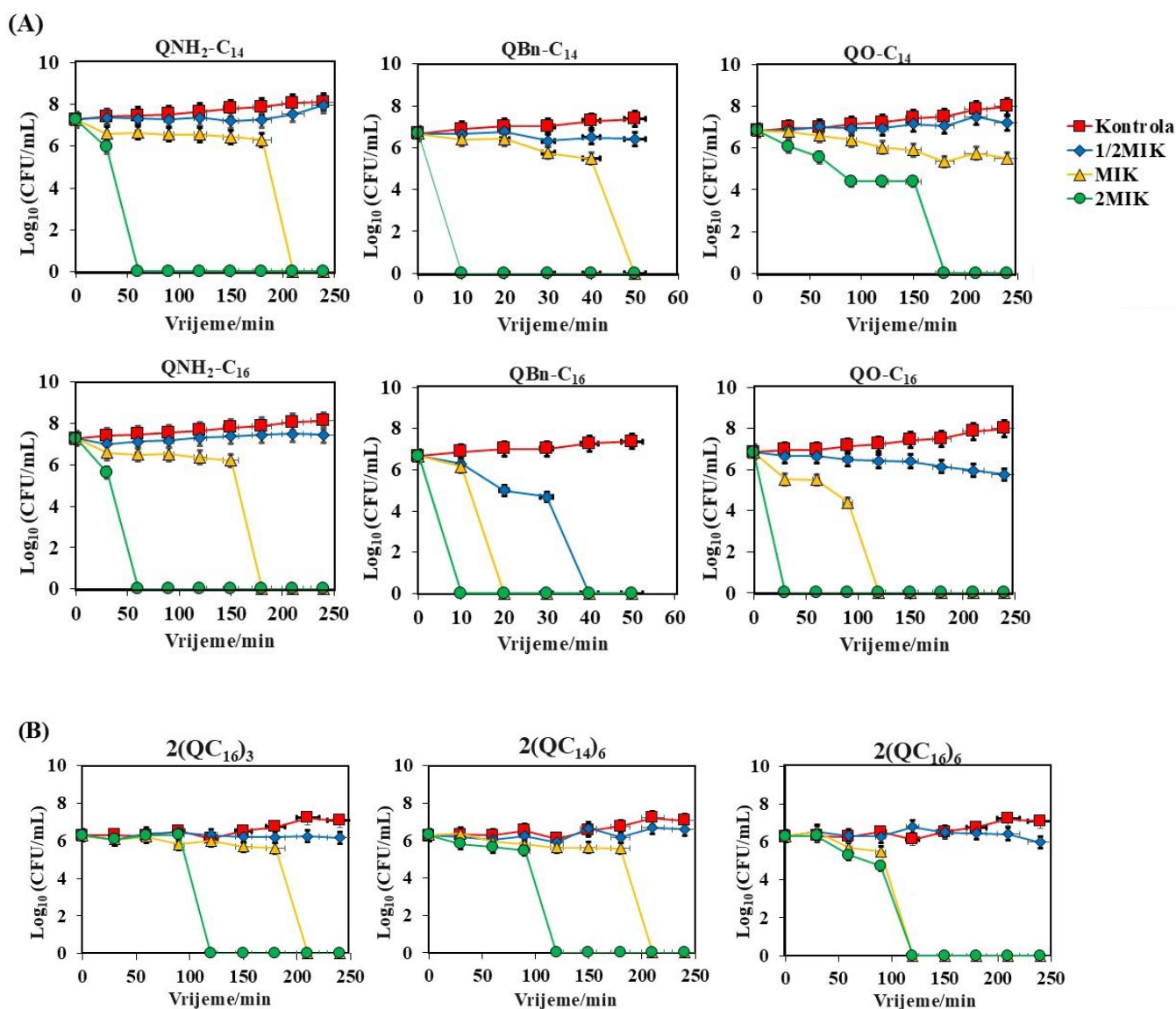
Ispitivani biskvaterni amonijevi spojevi kinuklidin-3-ona ostvaruju svoj membranolitički mehanizam djelovanja kroz baktericidni učinak, pri čemu potpuno eliminiraju bakterijsku populaciju unutar 24 sata. Međutim, kinetička analiza pokazuje da se brzina baktericidnog djelovanja značajno razlikuje među testiranim spojevima, pri čemu ključnu ulogu imaju duljina alkilnog lanca i rigidnost poveznica.

Spojevi 2(QC₁₆)₃ i 2(QC₁₄)₆ postižu baktericidni učinak unutar 3 sata izloženosti bakterijskom inokulumu, dok pri dvostruko većoj koncentraciji ($2 \times \text{MIK}$) eliminiraju bakterijsku populaciju već nakon 2 sata. Opažena razlika između ovih spojeva sugerira da duži alkilni lanci pridonose bržem i učinkovitijem membranolitičkom učinku, vjerojatno zbog povećane hidrofobne interakcije s lipidnim dvoslojem bakterijske membrane, što dovodi do brže destabilizacije membrane i posljedične smrti bakterijske stanice.

Najizraženiji baktericidni učinak pokazao je spoj 2(QC₁₆)₆, koji je protiv *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 djelovao najbrže, eliminirajući bakterijsku populaciju unutar 2 sata. Ovaj rezultat ukazuje na krucijalan doprinos duljine poveznica, pri čemu dulji i fleksibilniji poveznici mogu omogućiti optimalniju orijentaciju kvaternih amonijevih centara unutar bakterijske membrane, čime se povećava interakcija s lipidnim dvoslojem i pojačava membranolitički učinak.

Ovi nalazi potvrđuju da sinergijsko djelovanje duljine alkilnog lanca i rigidnosti poveznica igra ključnu ulogu u modulaciji baktericidne aktivnosti biskvaternih amonijevih spojeva. Optimizacija ovih parametara mogla bi doprinijeti razvoju učinkovitijih membranolitičkih antimikrobnih sredstava s brzim baktericidnim učinkom.

U cjelini, ovi rezultati potvrđuju početnu hipotezu o baktericidnom mehanizmu djelovanja te pružaju novi uvid u dosad nedokumentiran antibakterijski učinak mono- i biskvaternih amonijevih spojeva 3-supstituiranih kinuklidinijevih derivata.



Slika 42. Promjena logaritamskog broja jedinica koje formiraju kolonije po mililitru ($\log_{10}$ CFU mL^{-1}) tijekom vremena, određena metodom brojanja kolonija na hranjivoj podlozi. Prikazani su rezultati za bakterijski soj *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tretiran koncentracijama $\frac{1}{2}$ MIK, MIK i $2 \times$ MIK (A) monokvaternih i (B) biskvaternih amonijevih spojeva unutar definiranog vremenskog intervala.

4.4. Mehanizam djelovanja

4.4.1. Test propusnosti membrane prema propidijevom jodidu (PI Uptake assay) spektrofotometrijom

U okviru ove doktorske disertacije proučavana je membranolitička aktivnost novih derivata mono- i biskvaternih amonijevih spojeva protiv bakterije *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kao eksperimentalni pristup primijenjena je kvantifikacija unosa propidijevog jodida (PI), fluorescentnog markera koji se koristi kao pouzdan indikator oštećenja stanične membrane. Naime, PI je interkalacijska boja koja ne može prodrijeti kroz intaktnu membranu živih stanica, ali lako ulazi u stanice s narušenom membranskom barijerom, gdje se veže za nukleinske kiseline, uzrokujući značajno povećanje fluorescencije. Stoga se mjerenje intenziteta PI fluorescencije u realnom vremenu koristi kao indirektna mjera integriteta membrane te može pružiti uvid u litički potencijal ispitivanih spojeva.¹⁷⁸

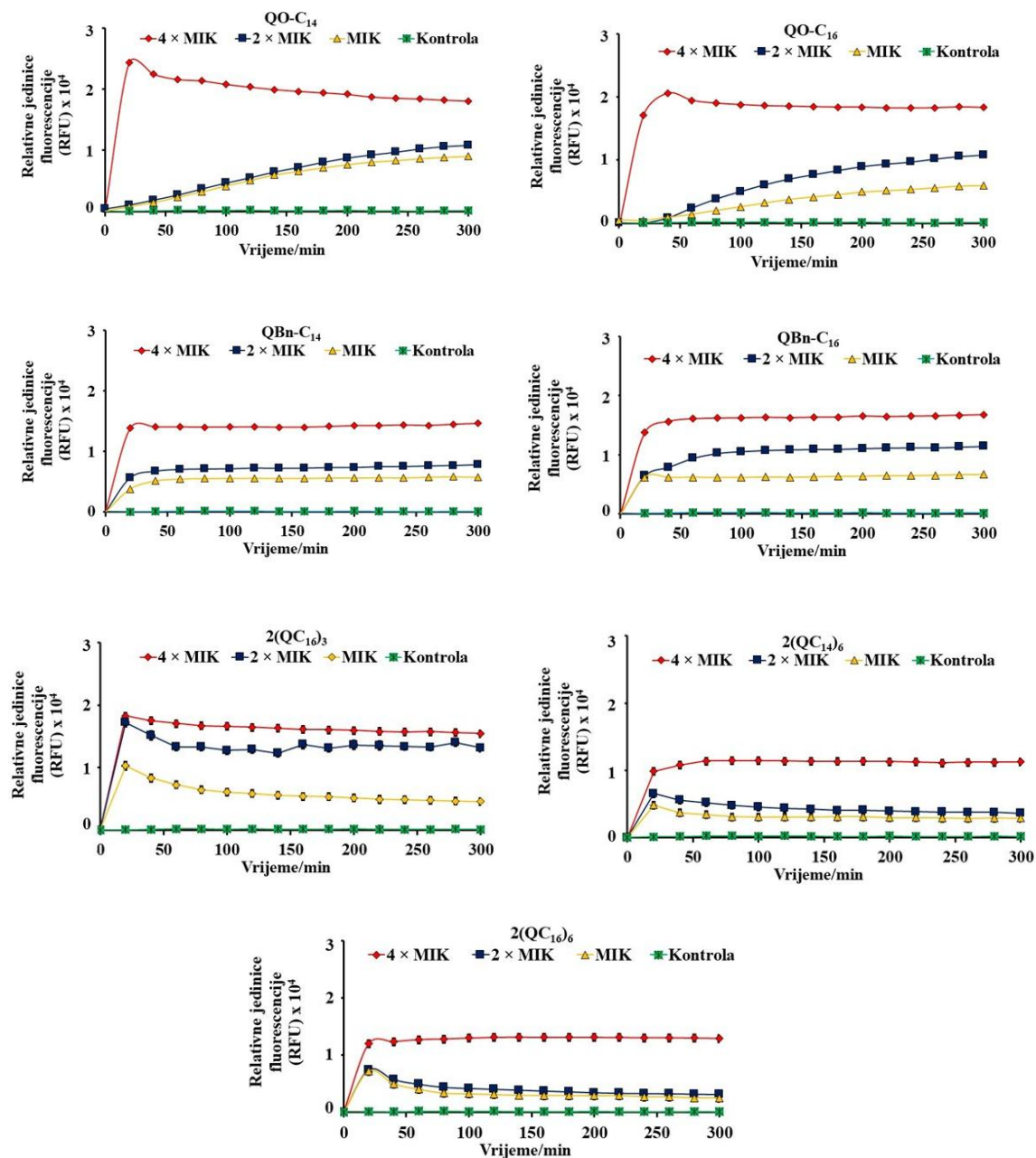
Dobiveni rezultati, prikazani na slici 43, ukazuju na izraženu koncentracijski ovisnu aktivnost QACs prema *S. aureus*. Pri minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK) te pri dvostrukoj vrijednosti MIK-a ($2 \times \text{MIK}$), zabilježen je unos propidijevog jodida, što se očitovalo progresivnim porastom apsorbancije tijekom promatranog vremenskog intervala od 300 minuta. Fluorescentni signali u tretiranim uzorcima bili su značajno viši u odnosu na one izmjerene u netretiranoj kontrolnoj populaciji, što ukazuje na kompromitaciju integriteta stanične membrane uslijed djelovanja ispitivanih kvaternih amonijevih soli (QACs) pri navedenim koncentracijama. Ovi rezultati sugeriraju da ispitivani spojevi induciraju povećanu propusnost membrane, što je u skladu s njihovim predloženim mehanizmom antibakterijskog djelovanja.

Pri koncentracijama koje odgovaraju četiri puta višoj vrijednosti MIK-a ($4 \times \text{MIK}$), zabilježen je trenutačan i strm porast fluorescentnog signala neposredno nakon izlaganja bakterijskih stanica ispitivanim derivatima kvaternih amonijevih soli (QACs). Usporednom analizom QAC derivata kinuklidin-3-ona i njihovih strukturnih analoga temeljenih na 3-benzamidokinuklidinu, uočava se da kvaterni amonijevi spojevi s okosnicom kinuklidina pri ovoj koncentraciji pokazuju izraženiji i brži membranolitički učinak. Ovakav nagli porast signala propidijevog jodida (PI) snažno ukazuje na brzu i učinkovitu permeabilizaciju stanične membrane, što podupire hipotezu da ispitivani spojevi djeluju primarno putem mehanizma narušavanja membrane, čime se onemogućuje preživljavanje bakterijskih stanica.

Među ispitivanim bisQACs — $2(\text{QC}_{16})_3$, $2(\text{QC}_{14})_6$ i $2(\text{QC}_{16})_6$ — najbrži membranski disruptivni učinci zabilježeni su kod spojeva sa poveznicom 6. Ovaj rezultat ističe ključnu ulogu prostorne udaljenosti između dvaju pozitivno nabijenih kvarternih amonijevih centara u modulaciji antibakterijske učinkovitosti. Kraći povezni lanci mogu povećati molekulsku rigidnost, čime se ograničava učinkovita interakcija sa bakterijskom membranom, dok dulji lanci omogućuju veću molekulsku fleksibilnost, što pogoduje konformacijskoj prilagodbi i učinkovitijem destabiliziranju lipidnog dvosloja. Ipak, predugi poveznica mogu smanjiti aktivnost narušavanjem strukturne organizacije potrebne za optimalno vezanje na membranu. Ovi rezultati, zajedno s koncentracijski ovisnim membranskim učincima zabilježenim na soju *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, naglašavaju važnost duljine poveznica i koncentracije spoja u dizajnu učinkovitih antimikrobnih reagensa. Daljnja istraživanja potrebna su za optimizaciju ovih parametara u svrhu poboljšanja terapijske primjene.

Eksperimentalne okolnosti, uključujući fazu rasta i gustoću bakterijske suspenzije, mogle su utjecati na interpretaciju PI fluorescencije. U ovom slučaju korištena je gušća suspenzija stanica u srednjoj eksponencijalnoj fazi, kako bi se osigurala dovoljna količina genetskog materijala za vezanje PI, čime se omogućilo pouzdanije očitavanje fluorescentnog signala. Međutim, izraženo membranolitičko djelovanje zabilježeno je tek pri vrlo visokim koncentracijama ispitivanih spojeva, koje nisu u skladu s MIK vrijednostima dobivenima korištenjem razrijeđenije bakterijske kulture. Ova razlika ukazuje na potrebu za metodološkom standardizacijom kako bi se omogućila konzistentna usporedba membranske aktivnosti i antimikrobnog potencijala.

Zaključno, ovi rezultati potvrđuju da ispitivani QACs derivati pokazuju izraženu antimikrobnu aktivnost prema *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pri čemu njihova učinkovitost djelovanja na staničnu membranu ovisi o koncentraciji. Dok niže koncentracije ispitivanih QACs derivata malo sporije narušavaju integritet membrane, više koncentracije dovode do brze permeabilizacije membrane i stanične smrti. Dobiveni eksperimentalni podaci naglašavaju potencijal QACs derivata kao učinkovitih antimikrobnih sredstava, osobito u kontekstu rastuće rezistencije bakterija na konvencionalne antibiotike. Buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na daljnje razjašnjavanje mehanizama membranskog djelovanja ovih spojeva, kao i na procjenu njihove učinkovitosti *in vivo* te njihove moguće toksičnosti prema eukariotskim stanicama, kako bi se otvorile mogućnosti za njihovu praktičnu primjenu u medicini i industriji.



Slika 43. Propusnost membrane prema propidijevom jodidu (*engl.* PI-uptake assay) u *S. aureus* ATCC 25923 bez prisutnosti antimikrobnog agensa (kontrola) te u prisutnosti antimikrobnog reagensa pri koncentracijama MIK, 2 × MIK i 4 × MIK tijekom 300 minuta.

5. Zaključci

U sklopu ove doktorske disertacije sintetizirane su nove mono- i biskvaterne amonijeve soli 3-supstituiranog kinuklidina, koje do sada nisu bile opisane u dostupnoj znanstvenoj literaturi. Monokvaterni derivati razlikuju se po prirodi supstituenta na trećem ugljikovom atomu kinuklidinijevog kostura te po duljini alkilnog lanca, dok se biskvaterni spojevi razlikuju po duljini i fleksibilnosti poveznica koji povezuje dva kvaterna amonijeva centra te poduljini alkilnog lanca na trećem ugljikovom atomu molekule kinuklidina. Strukture spojeva potvrđene su spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (^1H i ^{13}C NMR), a njihova čistoća određena je točkom tališta.

Sinteza i karakterizacija spojeva bile su praćene opsežnim biološkim i fizikalno-kemijskim istraživanjima s ciljem procjene antibakterijske aktivnosti, mehanizma djelovanja te potencijala za farmaceutsku primjenu. Provedeni su različiti *in vitro* eksperimenti: određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), kinetike inhibicije rasta, razvoja rezistencije, viabilnosti stanica te integriteta stanične membrane pomoću testa propusnosti prema propidijevom jodidu. Uz to, provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija spojeva, uključujući određivanje kritične micelarne koncentracije (cmc), procjenu lipofilnosti (cLogP) te permeabilnosti kroz umjetnu membranu pomoću PAMPA testa.

Na temelju dobivenih rezultata, mogu se izvući sljedeći zaključci:

Strukturne značajke i antibakterijska aktivnost

- Monokvaterni amonijevi spojevi (monoQACs) s duljim alkilnim lancima (C_{14} i C_{16}) pokazali su znatno niže MIK vrijednosti, osobito prema Gram-pozitivnim bakterijama, s antibakterijskom aktivnošću usporedivom ili superiornom u odnosu na komercijalne kvaterne amonijeve spojeve (BAB, CPC). Spojevi s kraćim alkilnim lancima (C_{12}) pokazali su slabiju aktivnost.
- Utvrđena je jasna korelacija između duljine alkilnog lanca i antibakterijske aktivnosti: dulji alkilni lanci omogućuju bolju inkorporaciju u lipidni dvosloj bakterijske membrane, čime se povećava disruptivni učinak na membransku strukturu.
- Polarnost supstituenata na kinuklidinskom prstenu, osobito prisutnost karbonilne ili amidne skupine na položaju 3, utjecala je na ukupnu hidrofobno-hidrofilnu ravnotežu molekule. Spojevi s umjereno polarnim supstituentima pokazali su optimalnu membransku

aktivnost, dok su izrazito polarni supstituenti smanjili sposobnost interakcije s hidrofobnim dijelovima bakterijske membrane.

- Protonirana amino skupina, u spojevima s dugim alkilnim lancima, dodatno je pojačala interakciju s negativno nabijenom površinom bakterijske membrane putem elektrostatskih interakcija oponašajući bisQACs, čime se potencirao membranski poremećaj i povećala baktericidna učinkovitost.

Biskvaterni spojevi (bisQACs) derivirani iz kinuklidin-3-ona pokazali su da duljina i fleksibilnost poveznica značajno utječu na biološku aktivnost. Spojevi s optimalnom duljinom poveznica ostvarili su bolju interakciju s bakterijskom membranom, dok su spojevi s prekratkim poveznicom pokazali smanjenu aktivnost.

Utjecaj medija na antibakterijski učinak

- U obogaćenom bakterijskom mediju (CA-MH), MIK vrijednosti ostale su djelomično nepromijenjene, dok su u DMEM mediju zabilježene značajno niže MIK vrijednosti. Ovi rezultati upućuju na to da sastav medija može modulirati antibakterijsku učinkovitost QACs, vjerojatno putem promjene elektrostatskih interakcija između spojeva i bakterijske membrane.

Mehanizam djelovanja i potencijal razvoja rezistencije

- Eksperimenti propusnosti membrane ukazali su na koncentracijsko-ovisni membranski mehanizam djelovanja, pri čemu visoke koncentracije spojeva dovode do brze permeabilizacije stanične membrane, a niske koncentracije su sporije utjecale na njezin integritet.
- Monokvaterni spojevi derivirani iz kinuklidin-3-ona nisu prepoznati kao supstrati QacA/B efluksnih pumpi, što ukazuje na nizak potencijal za razvoj bakterijske rezistencije.
- Biskvaterni spojevi pokazali su stabilnost u prisutnosti intrinzičnih sustava rezistencije, s identičnim MIK vrijednostima, što implicira slab afinitet prema efluksnim pumpama i dodatno potvrđuje njihov terapijski potencijal.

Baktericidna aktivnost i inhibicija biofilмова

- Ispitani spojevi pokazali su izraženu sposobnost inhibicije i eradikacije bakterijskih biofilмова *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*, pokazujući bolju učinkovitost od referentnih komercijalnih QACs odnosno antibiotika.
- Novosintetizirani spojevi mono- i biskvaterni amonijevih spojeva 3-supstituiranog kinuklidina pokazali su baktericidni mehanizam djelovanja.

Odnos strukture i aktivnosti (SAR)

- Rezultati molekularno-dinamičkih simulacija pokazali su nizak afinitet ispitivanih spojeva prema transkripcijskom regulatornom proteinu QacR. Takvi rezultati upućuju na smanjeni potencijal za induciranje efluksom posredovane rezistencije, koja je jedno od čestih ograničenja konvencionalnih QACs.

Amfifilna i farmakokinetička svojstva spojeva

- Svi spojevi pokazali su površinski aktivna svojstva, pri čemu je dulji alkilni lanac rezultirao nižom vrijednošću cmc-a, što je povezano s povećanom hidrofobnošću i boljim agregiranjem u micelarne strukture.
- Biskvaterni spojevi imali su više cLogP vrijednosti u usporedbi s monokvaternim spojevima, što ukazuje na veću lipofilnost i bolju sposobnost penetracije kroz biološke membrane.
- PAMPA test pokazao je nisku pasivnu difuziju spojeva QBn-C₁₄ i QBn-C₁₆, pri čemu je potonji pokazao višu sposobnost inkorporacije u umjetnu membranu, uz minimalnu prisutnost u vodenim fazama, što upućuje na nisku sistemsku apsorpciju i potencijalnu topikalnu primjenu.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da sintetizirani mono- i biskvaterni amonijevi spojevi 1-azabiciklo[2.2.2]oktana predstavljaju obećavajuće antimikrobne agense s izraženom biološkom aktivnošću, niskim potencijalom za razvoj bakterijske rezistencije te povoljnim fizikalno-kemijskim svojstvima. Njihova učinkovitost u inhibiciji patogenih bakterijskih sojeva, uključujući biofilmove, kao i sposobnost selektivne interakcije s bakterijskim membranama – modulirane polarnosti supstituenata, duljinom alkilnog lanca i prisutnošću protoniranih funkcionalnih skupina – čine ih pogodnim kandidatima za daljnji razvoj, osobito u kontekstu topikalne terapije i borbe protiv infekcija uzrokovanih rezistentnim mikroorganizmima.

6. Literatura

1. Dan, W.; Gao, J.; Qi, X.; Wang, J.; Dai, J. Antibacterial Quaternary Ammonium Agents: Chemical Diversity and Biological Mechanism. *Eur. J. Med. Chem.* **2022.**, *243*, 114765. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114765>
2. Alkhalifa, S.; Jennings, M.C.; Granata, D.; Klein, M.; Wuest, W.M.; Minbiole, K.P.C.; Carnevale, V. Analysis of the Destabilization of Bacterial Membranes by Quaternary Ammonium Compounds: A Combined Experimental and Computational Study. *ChemBioChem* **2020.**, *21*, 1510–1516. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900698>
3. Hoque, J.; Konai, M.M.; Gonuguntla, S.; Manjunath, G.B.; Samaddar, S.; Yarlagadda, V.; Haldar, J. Membrane Active Small Molecules Show Selective Broad Spectrum Antibacterial Activity with No Detectable Resistance and Eradicate Biofilms. *J. Med. Chem.* **2015.**, *58*, 5486–5500. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00443>
4. Jennings, M.C.; Minbiole, K.P.C.; Wuest, W.M. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect. Dis.* **2015.**, *1*, 288–303. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00047>
5. Hympanova, M.; Terlep, S.; Markova, A.; Prchal, L.; Dogsa, I.; Pulkrabkova, L.; Benkova, M.; Marek, J.; Stopar, D. The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria. *Front. Microbiol.* **2020.**, *11*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573951>
6. Miguere, N.; Debaille, C.; Walusiak-Skorupa, J.; Lipińska-Ojrzanowska, A.; Munoz, X.; van Kampen, V.; Suojalehto, H.; Suuronen, K.; Seed, M.; Lee, S.; et al. Occupational Asthma Caused by Quaternary Ammonium Compounds: A Multicenter Cohort Study. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2021.**, *9*, 3387–3395. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.04.041>
7. Yang, J.S.; Song, D.; Lee, B.; Ko, W.J.; Park, S.K.; Won, M.; Lee, K.; Kim, H.M.; Han, G. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Aliphatic Amido-Quaternary Ammonium Salts for Anticancer Chemotherapy: Part I. *Eur. J. Med. Chem.* **2011.**, *46*, 2861–2866. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.009>
8. Lu, J.; Guo, J. Disinfection Spreads Bacterial Resistance. *Science.* **2021.**, *371*, 473. <https://doi.org/10.1126/science.abg4380>

9. Mao, X.; Aue, D.L.; Buchalla, W.; Hiller, K.A.; Maisch, T.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Cieplik, F. Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020.**, *64*. <https://doi:10.1128/AAC.00576-20>
10. Hora, P.I.; Pati, S.G.; McNamara, P.J.; Arnold, W.A. Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2020.**, *7*, 622–631. <https://doi:10.1021/acs.estlett.0c00437>
11. Grkovic, S.; Brown, M.H.; Schumacher, M.A.; Brennan, R.G.; Skurray, R.A. The Staphylococcal QacR Multidrug Regulator Binds a Correctly Spaced Operator as a Pair of Dimers. *J. Bacteriol.* **2001.**, *183*, 7102–7109. <https://doi:10.1128/JB.183.24.7102-7109.2001>
12. Skočibušić, M.; Odžak, R.; Štefanić, Z.; Križić, I.; Krišto, L.; Jović, O.; Hrenar, T.; Primožič, I.; Jurašin, D. Structure-Property Relationship of Quinuclidinium Surfactants-Towards Multifunctional Biologically Active Molecules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016.**, *140*, 548–559. <https://doi:10.1016/j.colsurfb.2015.11.023>
13. Čarija, D.; Krce, L.; Mastelić, L.; Maravić, A.; Soldo, B.; Aviani, I.; Primožič, I.; Odžak, R.; Šprung, M. The Mode of Antibacterial Action of Quaternary N-Benzylimidazole Salts against Emerging Opportunistic Pathogens. *Bioorg. Chem.* **2021.**, *112*, 104938. <https://doi:10.1016/j.bioorg.2021.104938>
14. Odžak, R.; Šprung, M.; Soldo, B.; Skočibušić, M.; Gudelj, M.; Muić, A.; Primožič, I. Quaternary Salts Derived from 3-Substituted Quinuclidine as Potential Antioxidative and Antimicrobial Agents. *Open Chem.* **2017.**, *15*, 320–331. <https://doi:10.1515/chem-2017-0031>
15. Bazina, L.; Maravić, A.; Krce, L.; Soldo, B.; Odžak, R.; Popović, V.B.; Aviani, I.; Primožič, I.; Šprung, M. Discovery of Novel Quaternary Ammonium Compounds Based on Quinuclidine-3-Ol as New Potential Antimicrobial Candidates. *Eur. J. Med. Chem.* **2019.**, *163*, 626–635. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2018.12.023>
16. Boratyński, P.J.; Zielińska-Błajet, M.; Skarżewski, J. Cinchona Alkaloids—Derivatives and Applications. *Alkaloids Chem. Biol.* **2019.**, *82*, 29–145.

<https://doi:10.1016/bs.alkal.2018.11.001>

17. Yeboah, E.M.O.; Yeboah, S.O.; Singh, G.S. Recent Applications of Cinchona Alkaloids and Their Derivatives as Catalysts in Metal-Free Asymmetric Synthesis. *Tetrahedron* **2011.**, *67*, 1725–1762. <https://doi:10.1016/j.tet.2010.12.050>
18. Böhme, T.M.; Keim, C.; Dannhardt, G.; Mutschler, E.; Lambrecht, G. Design and Pharmacology of Quinuclidine Derivatives as M2-Selective Muscarinic Receptor Ligands. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001.**, *11*, 1241–1243. [https://doi:10.1016/S0960-894X\(01\)00186-X](https://doi:10.1016/S0960-894X(01)00186-X)
19. Hamama, W.S.; Abd El-Magid, O.M.; Zoorob, H.H. Chemistry of Quinuclidines as Nitrogen Bicyclic Bridged-Ring Structures. *J. Heterocycl. Chem.* **2006.**, *43*, 1397–1420. <https://doi:10.1002/jhet.5570430601>
20. Joyce, M.D.; Jennings, M.C.; Santiago, C.N.; Fletcher, M.H.; Wuest, W.M.; Minbiole, K.P. Natural Product-Derived Quaternary Ammonium Compounds with Potent Antimicrobial Activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2016.**, *69*, 344–347. <https://doi:10.1038/ja.2015.107>
21. Leitgeb, A.J.; Feliciano, J.A.; Sanchez, H.A.; Allen, R.A.; Morrison, K.R.; Sommers, K.J.; Carden, R.G.; Wuest, W.M.; Minbiole, K.P.C.C. Further Investigations into Rigidity-Activity Relationships in BisQAC Amphiphilic Antiseptics. *ChemMedChem* **2020.**, *15*, 667–670. <https://doi:10.1002/cmdc.201900662>
22. Kontos, R.C.; Schallenhammer, S.A.; Bentley, B.S.; Morrison, K.R.; Feliciano, J.A.; Tasca, J.A.; Kaplan, A.R.; Bezpalko, M.W.; Kassel, W.S.; Wuest, W.M.; et al. An Investigation into Rigidity–Activity Relationships in BisQAC Amphiphilic Antiseptics. *ChemMedChem* **2019.**, *14*, 83–87. <https://doi:10.1002/cmdc.201800622>
23. Haraguchi, N.; Ahamed, P.; Parvez, M.; Itsuno, S. Synthesis of Main-Chain Chiral Quaternary Ammonium Polymers for Asymmetric Catalysis Using Quaternization Polymerization. *Molecules* **2012.**, *17*, 7569–7583. <https://doi:10.3390/molecules17067569>
24. Forman, M.E.; Fletcher, M.H.; Jennings, M.C.; Duggan, S.M.; Minbiole, K.P.C.C.; Wuest, W.M. Structure-Resistance Relationships: Interrogating Antiseptic Resistance in Bacteria with Multicationic Quaternary Ammonium Dyes. *ChemMedChem* **2016.**, *11*, 958–962. <https://doi:10.1002/cmdc.201600095>

25. Arnold, W.A.; Blum, A.; Branyan, J.; Bruton, T.A.; Carignan, C.C.; Cortopassi, G.; Datta, S.; Dewitt, J.; Doherty, A.; Halden, R.U.; et al. Quaternary Ammonium Compounds: A Chemical Class of Emerging Concern. *Environ. Sci. Technol.* **2023.**, *57*, 7645–7665. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c08244>
26. Smith, J.G.; Companies, M.-H. *Organic Chemistry*; 6th ed.; McGraw-Hill Education, **2020.**; ISBN 9781259254888.
27. Bürgi, J.J.; Awale, M.; Boss, S.D.; Schaer, T.; Marger, F.; Viveros-Paredes, J.M.; Bertrand, S.; Gertsch, J.; Bertrand, D.; Reymond, J.L. Discovery of Potent Positive Allosteric Modulators of the A3 β 2 Nicotinic Acetylcholine Receptor by a Chemical Space Walk in Chembl. *ACS Chem. Neurosci.* **2014.**, *5*, 346–359. <https://doi:10.1021/cn4002297>
28. Hong, Z.; Yu, T.T.; Yasir, M.; Sara, M.; Black, D.S.C.; Willcox, M.D.P.; Kuppusamy, R.; Kumar, N. Daidzein-Based Amphiphilic Small Molecular Antimicrobial Peptidomimetics as Novel Antimicrobial Agents with Anti-Biofilm Activity. *ChemistrySelect* **2024.**, *9*, e202400502. <https://doi:10.1002/slct.202400502>
29. Kuppusamy, R.; Yasir, M.; Yee, E.; Willcox, M.; Black, D.S.C.; Kumar, N. Guanidine Functionalized Anthranilamides as Effective Antibacterials with Biofilm Disruption Activity. *Org. Biomol. Chem.* **2018.**, *16*, 5871–5888. <https://doi:10.1039/c8ob01699b>
30. Sapozhnikov, S. V.; Sabirova, A.E.; Shtyrlin, N. V.; Druk, A.Y.; Agafonova, M.N.; Chirkova, M.N.; Kazakova, R.R.; Grishaev, D.Y.; Nikishova, T. V.; Krylova, E.S.; et al. Design, Synthesis, Antibacterial Activity and Toxicity of Novel Quaternary Ammonium Compounds Based on Pyridoxine and Fatty Acids. *Eur. J. Med. Chem.* **2021.**, *211*, 113100. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2020.113100>
31. De Macedo-Silva, S.T.; Visbal, G.; Urbina, J.A.; De Souza, W.; Rodrigues, J.C.F. Potent in Vitro Antiproliferative Synergism of Combinations of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors against *Leishmania Amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015.**, *59*, 6402–6418. <https://doi:10.1128/AAC.01150-15>
32. Jiang, Y.; Chen, Y.; Song, Z.; Tan, Z.; Cheng, J. Recent Advances in Design of Antimicrobial Peptides and Polypeptides toward Clinical Translation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021.**, *170*, 261–280. <https://doi:10.1016/j.addr.2020.12.016>

33. Mangino, J.E.; Firstenberg, M.S.; Milewski, R.K.C.; Rhys-Williams, W.; Lees, J.P.; Dane, A.; Love, W.G.; Gonzalez Moreno, J. Exeporfinium Chloride (XF-73) Nasal Gel Dosed over 24 Hours Prior to Surgery Significantly Reduced Staphylococcus Aureus Nasal Carriage in Cardiac Surgery Patients: Safety and Efficacy Results from a Randomized Placebo-Controlled Phase 2 Study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2023.**, *28*, 1171–1173. <https://doi:10.1017/ice.2023.17>
34. Riedlová, K.; Saija, M.C.; Olżyńska, A.; Jurkiewicz, P.; Daull, P.; Garrigue, J.S.; Cwiklik, L. Influence of BAKs on Tear Film Lipid Layer: In Vitro and in Silico Models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2023.**, *186*, 65–73. <https://doi:10.1016/j.ejpb.2023.03.007>
35. Dutescu, R.M.; Uthoff, D.; Panfil, C.; Schrage, N. High-Frequency Application of Cationic Agents Containing Lubricant Eye Drops Causes Cumulative Corneal Toxicity in an Ex Vivo Eye Irritation Test Model. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2020.**, *36*, 725–731. <https://doi:10.1089/jop.2020.0043>
36. T. W. Graham Solomons, Craig B. Fryhle, S.A.S. *Solomons' Organic Chemistry*; 13th ed.; John Wiley & Sons, **2022.**; ISBN 9781119768197.
37. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, **2012.**; ISBN 9780199270293.
38. Vereshchagin, A.N.; Frolov, N.A.; Egorova, K.S.; Seitkalieva, M.M.; Ananikov, V.P. Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials. *Int. J. Mol. Sci.* **2021.**, *22*, 6793. <https://doi.org/10.3390/ijms22136793>
39. Forman, M.E.; Jennings, M.C.; Wuest, W.M.; Minbiole, K.P.C.C. Building a Better Quaternary Ammonium Compound (QAC): Branched Tetracationic Antiseptic Amphiphiles. *ChemMedChem* **2016.**, *11*, 1401–1405. <https://doi:10.1002/cmdc.201600176>
40. Flanjak, L.; Lypirou, L.; Sakkas, V.; Roslev, P. Ecotoxicity and Rapid Degradation of Quaternary Ammonium Compounds (QACs) Subjected to Combined Vacuum UV and UV-C Treatment. *Chemosphere* **2024.**, *346*, 140584. <https://doi:10.1016/j.chemosphere.2023.140584>
41. Haldar, J.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. Synthesis and Antibacterial Properties of Novel

- Hydrolyzable Cationic Amphiphiles. Incorporation of Multiple Head Groups Leads to Impressive Antibacterial Activity. *J. Med. Chem.* **2005.**, 48, 3823. <https://doi:10.1021/jm049106l>
42. Jennings, M.C.; Ator, L.E.; Paniak, T.J.; Minbiole, K.P.C.C.; Wuest, W.M. Biofilm-Eradicating Properties of Quaternary Ammonium Amphiphiles: Simple Mimics of Antimicrobial Peptides. *Chembiochem* **2014.**, 15, 2211–2215. <https://doi:10.1002/cbic.201402254>
43. Black, J.W.; Jennings, M.C.; Azarewicz, J.; Paniak, T.J.; Grenier, M.C.; Wuest, W.M.; Minbiole, K.P.C. TMEDA-Derived Biscationic Amphiphiles: An Economical Preparation of Potent Antibacterial Agents Dedicated to Professor Amos B. Smith, III, in Celebration of His 40 Years of Mentoring Scientists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014.**, 24, 99–102. <https://doi:10.1016/j.bmcl.2013.11.070>
44. Jennings, M.C.; Buttaro, B.A.; Minbiole, K.P.C.C.; Wuest, W.M. Bioorganic Investigation of Multicationic Antimicrobials to Combat QAC-Resistant Staphylococcus Aureus. *ACS Infect. Dis.* **2016.**, 1, 304–309. <https://doi:10.1021/acsinfecdis.5b00032>
45. Ning, C.; Li, L.; Logsetty, S.; Ghanbar, S.; Guo, M.; Ens, W.; Liu, S. Enhanced Antibacterial Activity of New “Composite” Biocides with Both N-Chloramine and Quaternary Ammonium Moieties. *RSC Adv.* **2015.**, 5, 93877–93887. <https://doi:10.1039/c5ra15714e>
46. Yasa, S.R.; Kaki, S.S.; Poornachandra, Y.; Kumar, C.G.; Penumarthy, V. Synthesis, Characterization, Antimicrobial and Biofilm Inhibitory Studies of New Esterquats. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016.**, 26, 1978–1982. <https://doi:10.1016/j.bmcl.2016.03.002>
47. Belay, C.; Steinman, N.Y.; Campos, L.M.; Dzikowski, R.; Golenser, J.; Domb, A.J. Asymmetric Trisalkylamine Cyclopropenium Derivatives with Antimicrobial Activity. *Bioorg. Chem.* **2020.**, 102, 104069. <https://doi:10.1016/j.bioorg.2020.104069>
48. Zhang, L.; Feng, X.Z.; Xiao, Z.Q.; Fan, G.R.; Chen, S.X.; Liao, S.L.; Luo, H.; Wang, Z. De Design, Synthesis, Antibacterial, Antifungal and Anticancer Evaluations of Novel β -Pinene Quaternary Ammonium Salts. *Int. J. Mol. Sci.* **2021.**, 22, 11299. <https://doi:10.3390/ijms222011299>

49. Grenier, M.C.; Davis, R.W.; Wilson-Henjum, K.L.; LaDow, J.E.; Black, J.W.; Caran, K.L.; Seifert, K.; Minbiole, K.P.C.C. The Antibacterial Activity of 4,4'-Bipyridinium Amphiphiles with Conventional, Bicephalic and Gemini Architectures. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012.**, *22*, 4055–4058. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.079>
50. Demchenko, S.; Lesyk, R.; Yadlovskiy, O.; Zuegg, J.; Elliott, A.G.; Drapak, I.; Fedchenkova, Y.; Suvorova, Z.; Demchenko, A. Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of New 3-Aryl-5H-Pyrrolo[1,2-a]Imidazole and 5H-Imidazo[1,2-a]Azepine Quaternary Salts. *Molecules* **2021.**, *26*, 4253. <https://doi.org/10.3390/molecules26144253>
51. Zhang, N.; Song, D.; Chen, W.; Zhang, S.; Zhang, P.; Zhang, N.; Ma, S. Modification of 5-Methylphenanthridium from Benzothiazoles to Indoles as Potent FtsZ Inhibitors: Broadening the Antibacterial Spectrum toward Vancomycin-Resistant Enterococci. *Eur. J. Med. Chem.* **2021.**, *224*, 113723. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113723>
52. Malinak, D.; Dolezal, R.; Marek, J.; Salajkova, S.; Soukup, O.; Vejsova, M.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Penhaker, M.; Musilek, K.; et al. 6-Hydroxyquinolinium Salts Differing in the Length of Alkyl Side-Chain: Synthesis and Antimicrobial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014.**, *24*, 5328. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.060>
53. Kayumov, A.R.; Nureeva, A.A.; Trizna, E.Y.; Gazizova, G.R.; Bogachev, M.I.; Shtyrin, N. V.; Pugachev, M. V.; Sapozhnikov, S. V.; Shtyrin, Y.G. New Derivatives of Pyridoxine Exhibit High Antibacterial Activity against Biofilm-Embedded Staphylococcus Cells. *Biomed Res. Int.* **2015.**, *2015*, 890968. <https://doi.org/10.1155/2015/890968>
54. Vafina, R.M.; Grishaev, D.Y.; Pavelyev, R.S.; Kazakova, R.R.; Agafonova, M.N.; Iksanova, A.G.; Lisovskaya, S.A.; Zeldi, M.I.; Krylova, E.S.; Nikitina, E. V; et al. Novel Bis-Ammonium Salts of Pyridoxine : Synthesis and Antimicrobial Properties. *Molecules* **2020.**, *25*, 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules25184341>
55. Sun, N.; Du, R.L.; Zheng, Y.Y.; Huang, B.H.; Guo, Q.; Zhang, R.F.; Wong, K.Y.; Lu, Y.J. Antibacterial Activity of N-Methylbenzofuro[3,2-b]Quinoline and N-Methylbenzoindolo[3,2-b]-Quinoline Derivatives and Study of Their Mode of Action. *Eur. J. Med. Chem.* **2017.**, *135*, 1–11, <https://doi.org/10.3390/molecules25184341>
56. Aoki, T.; Yoshizawa, H.; Yamawaki, K.; Yokoo, K.; Sato, J.; Hisakawa, S.; Hasegawa, Y.; Kusano, H.; Sano, M.; Sugimoto, H.; et al. Cefiderocol (S-649266), A New Siderophore

- Cephalosporin Exhibiting Potent Activities against *Pseudomonas Aeruginosa* and Other Gram-Negative Pathogens Including Multi-Drug Resistant Bacteria: Structure Activity Relationship. *Eur. J. Med. Chem.* **2018.**, *155*, 847–868. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2018.06.014>
57. Chu, W.C.; Bai, P.Y.; Yang, Z.Q.; Cui, D.Y.; Hua, Y.G.; Yang, Y.; Yang, Q.Q.; Zhang, E.; Qin, S. Synthesis and Antibacterial Evaluation of Novel Cationic Chalcone Derivatives Possessing Broad Spectrum Antibacterial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018.**, *143*, 905–921. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2017.12.009>
58. Fedorowicz, J.; Sączewski, J.; Konopacka, A.; Waleron, K.; Lejnowski, D.; Ciura, K.; Tomašič, T.; Skok, Ž.; Savijoki, K.; Morawska, M.; et al. Synthesis and Biological Evaluation of Hybrid Quinolone-Based Quaternary Ammonium Antibacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2019.**, *179*, 576–590. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2019.06.071>
59. Yu, T.T.; Kuppusamy, R.; Yasir, M.; Hassan, M.M.; Alghalayini, A.; Gadde, S.; Deplazes, E.; Cranfield, C.; Willcox, M.D.P.; Black, D.S.; et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Biphenylglyoxamide-Based Small Molecular Antimicrobial Peptide Mimics as Antibacterial Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2020.**, *21*, 1–38. <https://doi:10.3390/ijms21186789>
60. Li, H.; Liu, J.; Liu, C.F.; Li, H.; Luo, J.; Fang, S.; Chen, Y.; Zhong, R.; Liu, S.; Lin, S. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Membrane-Active Bakuchiol Derivatives as Effective Broad-Spectrum Antibacterial Agents. *J. Med. Chem.* **2021.**, *64*, 5603–5619. <https://doi:10.1021/acs.jmedchem.0c02059>
61. Guo, Y.; Hou, E.; Wen, T.; Yan, X.; Han, M.; Bai, L.P.; Fu, X.; Liu, J.; Qin, S. Development of Membrane-Active Honokiol/Magnolol Amphiphiles as Potent Antibacterial Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). *J. Med. Chem.* **2021.**, *64*, 12903–12916. <https://doi:10.1021/acs.jmedchem.1c01073>
62. Wang, X.; Qiu, H.; Yang, N.; Xie, H.; Liang, W.; Lin, J.; Zhu, H.; Zhou, Y.; Wang, N.; Tan, X.; et al. Fascaplysin Derivatives Binding to DNA via Unique Cationic Five-Ring Coplanar Backbone Showed Potent Antimicrobial/Antibiofilm Activity against MRSA in Vitro and in Vivo. *Eur. J. Med. Chem.* **2022.**, *230*, 114099. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2021.114099>
63. Fan, T.; Hu, X.; Tang, S.; Liu, X.; Wang, Y.; Deng, H.; You, X.; Jiang, J.; Li, Y.; Song, D. Discovery and Development of 8-Substituted Cycloberberine Derivatives as Novel

- Antibacterial Agents against MRSA. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018.**, 9, 484–489. <https://doi:10.1021/acsmedchemlett.8b00094>
64. Wen, S.Q.; Jeyakkumar, P.; Avula, S.R.; Zhang, L.; Zhou, C.H. Discovery of Novel Berberine Imidazoles as Safe Antimicrobial Agents by down Regulating ROS Generation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016.**, 26, 2768–2773. <https://doi:10.1016/j.bmcl.2016.04.070>
65. Oblak, E.; Piecuch, A.; Guz-Regner, K.; Dworniczek, E. Antibacterial Activity of Gemini Quaternary Ammonium Salts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014.**, 350, 190–198. <https://doi:10.1111/1574-6968.12331>
66. Fu, S.Q.; Guo, J.W.; Zhong, X.; Yang, Z.; Lai, X.F. Synthesis, Physiochemical Property and Antibacterial Activity of Gemini Quaternary Ammonium Salts with a Rigid Spacer. *RSC Adv.* **2016.**, 6, 16507–16515. <https://doi:10.1039/c5ra22368g>
67. Frolov, N.A.; Fedoseeva, K.A.; Hansford, K.A.; Vereshchagin, A.N. Novel Phenyl-Based Bis-Quaternary Ammonium Compounds as Broad-Spectrum Biocides. *ChemMedChem* **2021.**, 16, 2954–2959. <https://doi:10.1002/cmdc.202100284>
68. Ye, W.; Li, Y.; Zhou, Z.; Wang, X.; Yao, J.; Liu, J.; Wang, C. Synthesis and Antibacterial Activity of New Long-Chain-Alkyl Bile Acid-Based Amphiphiles. *Bioorg. Chem.* **2013.**, 51, 1–7. <https://doi:10.1016/j.bioorg.2013.08.003>
69. Elshaarawy, R.F.M.; Janiak, C. Toward New Classes of Potent Antibiotics: Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Metallosaldach-Imidazolium Salts. *Eur. J. Med. Chem.* **2014.**, 75, 31–42. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2013.09.029>
70. Shtyrilin, N. V.; Sapozhnikov, S. V.; Galiullina, A.S.; Kayumov, A.R.; Bondar, O. V.; Mirchink, E.P.; Isakova, E.B.; Firsov, A.A.; Balakin, K. V.; Shtyrilin, Y.G. Synthesis and Antibacterial Activity of Quaternary Ammonium 4-Deoxypyridoxine Derivatives. *Biomed Res. Int.* **2016.**, 2016, 3864193. <https://doi:10.1155/2016/3864193>
71. Brycki, B.; Koziróg, A.; Kowalczyk, I.; Pospieszny, T.; Materna, P.; Marciniak, J. Synthesis, Structure, Surface and Antimicrobial Properties of New Oligomeric Quaternary Ammonium Salts with Aromatic Spacers. *Molecules* **2017.**, 22, 1810. <https://doi:10.3390/molecules22111810>

72. Schallenger, S.A.; Duggan, S.M.; Morrison, K.R.; Bentley, B.S.; Wuest, W.M.; Minbiole, K.P.C.C. Hybrid BisQACs: Potent Biscationic Quaternary Ammonium Compounds Merging the Structures of Two Commercial Antiseptics. *ChemMedChem* **2017.**, *12*, 1931–1934. <https://doi:10.1002/cmdc.201700597>
73. Murakami, K.; Yumoto, H.; Murakami, A.; Amoh, T.; Viducic, D.; Hirota, K.; Tabata, A.; Nagamune, H.; Kourai, H.; Matsuo, T.; et al. Evaluation of the Effectiveness of the Potent Bis-Quaternary Ammonium Compound, 4,4'-(α,ω -Hexamethylenedithio) Bis (1-Octylpyridinium Bromide) (4DTBP-6,8) on *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* **2017.**, *122*, 893–899. <https://doi:10.1111/jam.13392>
74. Al-Khalifa, S.E.; Jennings, M.C.; Wuest, W.M.; Minbiole, K.P.C.C. The Development of Next-Generation Pyridinium-Based MultiQAC Antiseptics. *ChemMedChem* **2017.**, *12*, 280–283. <https://doi:10.1002/cmdc.201600546>
75. Shrestha, J.P.; Baker, C.; Kawasaki, Y.; Subedi, Y.P.; Vincent de Paul, N.N.; Takemoto, J.Y.; Chang, C.W.T. Synthesis and Bioactivity Investigation of Quinone-Based Dimeric Cationic Triazolium Amphiphiles Selective against Resistant Fungal and Bacterial Pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* **2017.**, *126*, 696–704. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2016.12.008>
76. Vereshchagin, A.N.; Gordeeva, A.M.; Frolov, N.A.; Proshin, P.I.; Hansford, K.A.; Egorov, M.P. Synthesis and Microbiological Properties of Novel Bis-Quaternary Ammonium Compounds Based on Biphenyl Spacer. *European J. Org. Chem.* **2019.**, *2019*, 4123–4127. <https://doi:10.1002/ejoc.201900319>
77. Thomas, B.; Duval, R.E.; Fontanay, S.; Varbanov, M.; Boisbrun, M. Synthesis and Antibacterial Evaluation of Bis-Thiazolium, Bis-Imidazolium, and Bis-Triazolium Derivatives. *ChemMedChem* **2019.**, *14*, 1232–1237. <https://doi:10.1002/cmdc.201900151>
78. Vereshchagin, A.N.; Frolov, N.A.; Konyuhova, V.Y.; Kapelistaya, E.A.; Hansford, K.A.; Egorov, M.P. Investigations into the Structure-Activity Relationship in Gemini QACs Based on Biphenyl and Oxydiphenyl Poveznica. *RSC Adv.* **2021.**, *11*, 3429–3438. <https://doi:10.1039/d0ra08900a>
79. Fedorowicz, J.; Sączewski, J. Advances in the Synthesis of Biologically Active Quaternary Ammonium Compounds. *Int J Mol Sci.* **2024.**, *25*, 4649. <https://doi:10.3390/ijms25094649>

80. Yarinich, L.A.; Burakova, E.A.; Zakharov, B.A.; Boldyreva, E. V.; Babkina, I.N.; Tikunova, N. V.; Silnikov, V.N. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Novel 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octane Derivatives as Potent Antimicrobial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015.**, *95*, 563–573. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2015.03.033>
81. Hoque, J.; Konai, M.M.; Sequeira, S.S.; Samaddar, S.; Haldar, J. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Cationic Small Molecules with Spatial Positioning of Hydrophobicity: An in Vitro and in Vivo Evaluation. *J. Med. Chem.* **2016.**, *59*, 10750–10762. <https://doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01435>
82. Chu, W.; Yang, Y.; Cai, J.; Kong, H.; Bai, M.; Fu, X.; Qin, S.; Zhang, E. Synthesis and Bioactivities of New Membrane-Active Agents with Aromatic Poveznica: High Selectivity and Broad-Spectrum Antibacterial Activity. *ACS Infect. Dis.* **2019.**, *5*, 1535–1545. <https://doi:10.1021/acsinfecdis.9b00078>
83. Chu, W.; Yang, Y.; Qin, S.; Cai, J.; Bai, M.; Kong, H.; Zhang, E. Low-Toxicity Amphiphilic Molecules Linked by an Aromatic Nucleus Show Broad-Spectrum Antibacterial Activity and Low Drug Resistance. *Chem. Commun.* **2019.**, *55*, 4307–4310. <https://doi:10.1039/c9cc00857h>
84. Motika, S.E.; Ulrich, R.J.; Geddes, E.J.; Lee, H.Y.; Lau, G.W.; Hergenrother, P.J. Gram-Negative Antibiotic Active Through Inhibition of an Essential Riboswitch. *J. Am. Chem. Soc.* **2020.**, *142*, 10856–10862. <https://doi:10.1021/jacs.0c04427>
85. Parker, E.N.; Drown, B.S.; Geddes, E.J.; Lee, H.Y.; Ismail, N.; Lau, G.W.; Hergenrother, P.J. Implementation of Permeation Rules Leads to a FabI Inhibitor with Activity against Gram-Negative Pathogens. *Nat. Microbiol.* **2020.**, *5*, 67–75. <https://doi:10.1038/s41564-019-0604-5>
86. Muñoz, K.A.; Hergenrother, P.J. Facilitating Compound Entry as a Means to Discover Antibiotics for Gram-Negative Bacteria. *Acc. Chem. Res.* **2021.**, *54*, 1322–1333. <https://doi:10.1021/acs.accounts.0c00895>
87. Richter, M.F.; Drown, B.S.; Riley, A.P.; Garcia, A.; Shirai, T.; Svec, R.L.; Hergenrother, P.J. Predictive Compound Accumulation Rules Yield a Broad-Spectrum Antibiotic. *Nature* **2017.**, *545*, 299–304. <https://doi:10.1038/nature22308>

88. Dai, J.; Dan, W.; Ren, S.; Shang, C.; Wang, J. Design, Synthesis and Biological Evaluations of Quaternization Harman Analogues as Potential Antibacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018.**, *160*, 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.012>
89. Paoprasert, P.; Spalenka, J.W.; Peterson, D.L.; Ruther, R.E.; Hamers, R.J.; Evans, P.G.; Gopalan, P. Grafting of Poly(3-Hexylthiophene) Brushes on Oxides Using Click Chemistry. *J. Mater. Chem.* **2010.**, *20*, 2651–2658. <https://doi.org/10.1039/b920233a>
90. Tizzotti, M.; Charlot, A.; Fleury, E.; Stenzel, M.; Bernard, J. Modification of Polysaccharides through Controlled/Living Radical Polymerization Grafting-towards the Generation of High Performance Hybrids. *Macromol. Rapid Commun.* **2010.**, *31*, 1751–1772. <https://doi.org/10.1002/marc.201000072>
91. Thakur, V.K.; Thakur, M.K.; Gupta, R.K. Graft Copolymers from Natural Polymers Using Free Radical Polymerization. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2013.**, *18*, 495–503. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2013.814241>
92. Ito, S.; Goseki, R.; Ishizone, T.; Hirao, A. Synthesis of Well-Controlled Graft Polymers by Living Anionic Polymerization towards Exact Graft Polymers. *Polym. Chem.* **2014.**, *5*, 5523–5534. <https://doi.org/10.1039/c4py00584h>
93. Pearce, E.M. Principles of Polymerization (Third Edition), by George Odian, Wiley-Interscience: New York, NY, USA, 1991; 768 pp. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1992.**, *30*, 1508. <https://doi.org/10.1002/pola.1992.080300734>
94. Sato, M.; Kato, T.; Ohishi, T.; Ishige, R.; Ohta, N.; White, K.L.; Hirai, T.; Takahara, A. Precise Synthesis of Poly(Methyl Methacrylate) Brush with Well-Controlled Stereoregularity Using a Surface-Initiated Living Anionic Polymerization Method. *Macromolecules* **2016.**, *49*, 2071–2076. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b02773>
95. Lego, B.; François, M.; Skene, W.G.; Giasson, S. Polymer Brush Covalently Attached to OH-Functionalized Mica Surface via Surface-Initiated ATRP: Control of Grafting Density and Polymer Chain Length. *Langmuir* **2009.**, *25*, 5313–5321. <https://doi.org/10.1021/la804060s>
96. Lv, C.; Xue, Q.; Xia, D.; Ma, M.; Xie, J.; Chen, H. Effect of Chemisorption on the Interfacial Bonding Characteristics of Graphene-Polymer Composites. *J. Phys. Chem. C* **2010.**, *114*, 6588–6594. <https://doi.org/10.1021/jp100110n>

97. Jiang, Z.; Miao, J.; He, Y.; Tu, K.; Chen, S.; Zhang, R.; Zhang, L.; Yang, H. A Novel Positively Charged Composite Nanofiltration Membrane Based on Polyethyleneimine with a Tunable Active Layer Structure Developed: Via Interfacial Polymerization. *RSC Adv.* **2019.**, 9, 10796–10806. <https://doi:10.1039/c9ra00253g>
98. Norde, W. Adsorption of Proteins from Solution at the Solid-Liquid Interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1986.**, 25, 267–340. [https://doi:10.1016/0001-8686\(86\)80012-4](https://doi:10.1016/0001-8686(86)80012-4)
99. de Nys, R.; Givskov, M.; Kumar, N.; Kjelleberg, S.; Steinberg, P.D. Furanones. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **2006.**, 42, 55–86. https://doi:10.1007/3-540-30016-3_2
100. Gaurav, A.; Bakht, P.; Saini, M.; Pandey, S.; Pathania, R. Role of Bacterial Efflux Pumps in Antibiotic Resistance, Virulence, and Strategies to Discover Novel Efflux Pump Inhibitors. *Microbiol. (United Kingdom)* **2023.**, 169, 1–13. <https://doi:10.1099/mic.0.001333>
101. Aggarwal, A.; Mehta, S.; Gupta, D.; Sheikh, S.; Pallagatti, S.; Singh, R.; Singla, I. Clinical & Immunological Erythematosus Patients Characteristics in Systemic Lupus Maryam. *J. Dent. Educ.* **2012.**, 76, 1532–1539. <https://doi:10.4103/ijmr.IJMR>
102. Hernando-Amado, S.; Blanco, P.; Alcalde-Rico, M.; Corona, F.; Reales-Calderón, J.A.; Sánchez, M.B.; Martínez, J.L. Multidrug Efflux Pumps as Main Players in Intrinsic and Acquired Resistance to Antimicrobials. *Drug Resist. Updat.* **2016.**, 28, 13–27. <https://doi:10.1016/j.drug.2016.06.007>
103. Paulsen, I.T.; Brown, M.H.; Littlejohn, T.G.; Mitchell, B.A.; Skurray, R.A. Multidrug Resistance Proteins QacA and QacB from Staphylococcus Aureus: Membrane Topology and Identification of Residues Involved in Substrate Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996.**, 93, 3630-3635. <https://doi:10.1073/pnas.93.8.3630>
104. Grkovic, S.; Brown, M.H.; Roberts, N.J.; Paulsen, I.T.; Skurray, R.A. QacR Is a Repressor Protein That Regulates Expression of the Staphylococcus Aureus Multidrug Efflux Pump QacA. *J. Biol. Chem.* **1998.**, 273, 18665-18673. <https://doi:10.1074/jbc.273.29.18665>
105. Zhang, N.; Ma, S. Recent Development of Membrane-Active Molecules as Antibacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2019.**, 184, 111743. <https://doi:10.1016/j.ejmech.2019.111743>
106. Mingeot-Leclercq, M.P.; Décout, J.L. Bacterial Lipid Membranes as Promising Targets to

- Fight Antimicrobial Resistance, Molecular Foundations and Illustration through the Renewal of Aminoglycoside Antibiotics and Emergence of Amphiphilic Aminoglycosides. *Medchemcomm* **2016.**, 7, 586–611. <https://doi.org/10.1039/c5md00503e>
107. Niu, Y.; Wang, M.; Cao, Y.; Nimmagadda, A.; Hu, J.; Wu, Y.; Cai, J.; Ye, X.S. Rational Design of Dimeric Lysine N -Alkylamides as Potent and Broad-Spectrum Antibacterial Agents. *J. Med. Chem.* **2018.**, 61, 2865–2874. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01704>
108. Morandini, A.; Leonetti, B.; Riello, P.; Sole, R.; Gatto, V.; Caligiuri, I.; Rizzolio, F.; Beghetto, V. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Bis-Morpholine Triazine Quaternary Ammonium Salts. *ChemMedChem* **2021.**, 16, 3172–3176. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100409>
109. Song, Z.; Wang, H.; Wu, Y.; Gu, J.; Li, S.; Han, H. Fabrication of Bis-Quaternary Ammonium Salt as an Efficient Bactericidal Weapon Against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *ACS Omega* **2018.**, 3, 14517–14525. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01265>
110. Raheem, N.; Straus, S.K. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Front. Microbiol.* **2019.**, 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02866>
111. Sun, H.; Huang, S.-Y.; Jeyakkumar, P.; Cai, G.-X.; Fang, B.; Zhou, C.-H. Natural Berberine-Derived Azolyl Ethanol as New Structural Antibacterial Agents against Drug-Resistant Escherichia Coli. *J. Med. Chem.* **2022.**, 65, 436–459. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01592>
112. Wann, D.A.; Blockhuys, F.; Van Alsenoy, C.; Robertson, H.E.; Himmel, H.J.; Tang, C.Y.; Cowley, A.R.; Downs, A.J.; Rankin, D.W.H. Molecular Structures of Free Quinuclidine and Its Adducts with Metal Trihydrides, MH₃ (M = B, Al or Ga), Studied by Gas-Phase Electron Diffraction, X-Ray Diffraction and Quantum Chemical Calculations. *Dalt. Trans.* **2007.**, 3, 1687–1696. <https://doi.org/10.1039/b701476g>
113. Odžak, R.; Šprung, M. Biological Activity of Monoquaternary Ammonium Compounds Based on 3-Substituted Quinuclidine: A Short Review. *Period. Biol.* **2020.**, 121–122, 15–21. <https://doi.org/10.18054/pb.v121-122i1-2.10603>

114. Kaufman, T.S.; Rúveda, E.A. The Quest for Quinine: Those Who Won the Battles and Those Who Won the War. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005.**, *44*, 854–885. <https://doi.org/10.1002/anie.200400663>
115. Mashkovsky, M.D.; Yakhontov, L.N.; Kaminka, M.E.; Mikhlin, E.E. Further Developments in Research on the Chemistry and Pharmacology of Synthetic Quinuclidine Derivatives. *Prog. drug Res. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Prog. des Rech. Pharm.* **1983.**, *27*, 9–61. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7115-0_1
116. Radman Kastelic, A.; Odžak, R.; Pezdirc, I.; Sović, K.; Hrenar, T.; Čipak Gašparović, A.; Skočibušić, M.; Primožič, I. New and Potent Quinuclidine-Based Antimicrobial Agents. *Molecules* **2019.**, *24*, 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24142675>
117. Langlois, M.; Soulier, J.L.; Allainmat, M.; Shen, S.; Gallais, C. Derivatives of Quinuclidine as 5-HT₃ Receptor Antagonists: Influence of an Additional Carbonyl Group on the Recognition of Chirality by the Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993.**, *3*, 1555–1558. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)80017-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)80017-7)
118. Sterling, G.H.; Doukas, P.H.; Sheldon, R.J.; O'Neill, J.J. In Vivo Protection against Soman Toxicity by Known Inhibitors of Acetylcholine Synthesis in Vitro. *Biochem. Pharmacol.* **1988.**, *37*, 379–384. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90202-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90202-X)
119. Amitai, G.; Rabinovitz, I.; Zomber, G.; Chen, R.; Cohen, G.; Adani, R.; Raveh, L. Bisquaternary Oximes as Antidotes against Tabun and Soman Poisoning. In *Enzymes of the Cholinesterase Family*; Quinn, D.M., Balasubramanian, A.S., Doctor, B.P., Taylor, P., Eds.; Springer US: Boston, MA, USA, **1995.**; pp. 345–352, ISBN 978-1-4899-1051-6.
120. Simeon-Rudolf, V.; Reiner, E.; Skrinjarić-Spoljar, M.; Radić, B.; Lucić, A.; Primožič, I.; Tomić, S. Quinuclidinium-Imidazolium Compounds: Synthesis, Mode of Interaction with Acetylcholinesterase and Effect upon Soman Intoxicated Mice. *Arch. Toxicol.* **1998.**, *72*, 289–295. <https://doi.org/10.1007/s002040050504>
121. Sterling, G.H.; Doukas, P.H.; Jackson, C.; Caccese, R.; O'Neill, K.J.; O'Neill, J.J. 3-Carbamyl-N-Allylquinuclidinium Bromide: Effects on Cholinergic Activity and Protection against Soman. *Biochem. Pharmacol.* **1993.**, *45*, 465–472. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90084-A](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90084-A)

122. Amitai, G.; Rabinovitz, I.; Zomber, G.; Chen, R.; Cohen, G.; Adani, R.; Raveh, L. Antidotal Efficacy of the Bisquaternary Oximes: AB-8, AB-13, Toxogonin, HI-6 and Hlo-7 against Tabun and Soman Poisoning. In *Proceedings of the 5th International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents*; **1995.**; pp. 247–254.
123. Kalir, A.; Sali, E.; Shirin, E. Preparation of (+)-3-Quinuclidinol. *Isr. J. Chem.* **1971.**, 9, 267–268. <https://doi.org/10.1002/ijch.197100040>
124. Rehavi, M.; Maayani, S.; Sokolovsky, M. Enzymatic Resolution and Cholinergic Properties of (±)3-Quinuclidinol Derivatives. *Life Sci.* **1977.**, 21, 1293–1302. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(77\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(77)90010-8)
125. Ringdahl, B.; Jope, R.S.; Jenden, D.J. Inhibition of High Affinity Choline Transport by Stereoisomers of Some 3-Quinuclidinol Derivatives. *Biochem. Pharmacol.* **1984.**, 33, 2819–2822. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90703-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90703-2)
126. Sternbach, L.H.; Kaiser, S. Antispasmodics. II. Esters of Basic Bicyclic Alcohols*. *J. Am. Chem. Soc.* **1952.**, 74, 2219–2221. <https://doi.org/10.1021/ja01129a020>
127. Primožič, I.; Hrenar, T.; Tomić, S.; Meić, Z. Structural Basis for Selectivity of Butyrylcholinesterase towards Enantiomeric Quinuclidin-3-Yl Benzoates: A Quantum Chemical Study. *Croat. Chem. Acta* **2003.**, 76, 93–99. <https://hrcak.srce.hr/file/151642>
128. Primožič, I.; Hrenar, T.; Tomić, S.; Meić, Z. Interactions of Chiral Quinuclidin-3-Yl Benzoates with Butyrylcholinesterase: Kinetic Study and Docking Simulations. *J. Phys. Org. Chem.* **2002.**, 15, 608–614. <https://doi.org/10.1002/poc.494>
129. Primožič, I.; Hrenar, T.; Tomić, S.; Meić, Z. Stereoselective Hydrolysis of Quaternary Quinuclidinium Benzoates Catalyzed by Butyrylcholinesterase. *European J. Org. Chem.* **2003.**, 2003, 295–301. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200390032>
130. Collins, A.N.; , Gary Sheldrake, J.C. Chirality in Industry: The Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds. *J. Chem. Educ.* **1993.**, 70, A146. <https://doi.org/10.1021/ed070pA146.2>
131. Langlois, M.; Meyer, C.; Soulier, J.L. Synthesis of (R) and (S)-3-Aminoquinuclidine from 3-Quinuclidinone and (S) and (R)-1-Phenethylamine. *Synth. Commun.* **1992.**, 22, 1895–1911. <https://doi.org/10.1080/00397919208021320>

132. Kowalczyk, B.A.; Rohloff, J.C.; Dvorak, C.A.; Gardner, J.O. Improved Preparation of (R) and (S)-3-Aminoquinuclidine Dihydrochloride. *Synth. Commun.* **1996.**, *26*, 2009–2015. <https://doi:10.1080/00397919608003556>
133. Vogel, A.I. Vogel - Practical Organic Chemistry 5Th Edition.Pdf **1996.**, 1540.
134. Odžak, R.; Tomić, S. 3-Amidoquinuclidine Derivatives: Synthesis of Compounds and Inhibition of Butyrylcholinesterase. *Bioorg. Chem.* **2006.**, *34*, 90–98. <https://doi:10.1016/j.bioorg.2006.01.004>
135. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition*; **2012.**; Vol. 32; ISBN 1562387839.
136. Bucur, F.I.; Grigore-Gurgu, L.; Crauwels, P.; Riedel, C.U.; Nicolau, A.I. Resistance of *Listeria Monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and Food Processing Environments. *Front. Microbiol.* **2018.**, *9*, 2700. <https://doi:10.3389/fmicb.2018.02700>
137. Bessa, L.J.; Ferreira, M.; Gameiro, P. Evaluation of Membrane Fluidity of Multidrug-Resistant Isolates of *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* in Presence and Absence of Antibiotics. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2018.**, *181*, 150–156. <https://doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.03.002>
138. Carr, A.C.; Maggini, S. Vitamin C and Immune Function. *Nutrients* **2017.**, *9*, 1–25. <https://doi:10.3390/nu9111211>
139. Theophel, K.; Schacht, V.J.; Schlüter, M.; Schnell, S.; Stingu, C.S.; Schaumann, R.; Bunge, M. The Importance of Growth Kinetic Analysis in Determining Bacterial Susceptibility against Antibiotics and Silver Nanoparticles. *Front. Microbiol.* **2014.**, *5*, 1–10. <https://doi:10.3389/fmicb.2014.00544>
140. Bertranda, R.L. Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. *J. Bacteriol.* **2019.**, *201*. <https://doi:10.1128/JB.00697-18>
141. Nunes, B.; Cagide, F.; Fernandes, C.; Borges, A.; Borges, F.; Simões, M. Efficacy of Novel Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts Differing in Cation Type and Alkyl Chain Length against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2023.**, *25*. <https://doi:10.3390/ijms25010504>

142. Kopiasz, R.J.; Tomaszewski, W.; Kuźmińska, A.; Chreptowicz, K.; Mierzejewska, J.; Ciach, T.; Jańczewski, D. Hydrophilic Quaternary Ammonium Ionenenes-Is There an Influence of Backbone Flexibility and Topology on Antibacterial Properties? *Macromol. Biosci.* **2020.**, *20*, e2000063. <https://doi:10.1002/mabi.202000063>
143. Santoro, O.; Izzo, L. Antimicrobial Polymer Surfaces Containing Quaternary Ammonium Centers (QACs): Synthesis and Mechanism of Action. *Int. J. Mol. Sci.* **2024.**, *25*, 7587. <https://doi:10.3390/ijms25147587>
144. Nadagouda, M.N.; Vijayasathy, P.; Sin, A.; Nam, H.; Khan, S.; Parambath, J.B.M.; Mohamed, A.A.; Han, C. Antimicrobial Activity of Quaternary Ammonium Salts: Structure-Activity Relationship. *Med. Chem. Res.* **2022.**, *31*, 1663–1678. <https://doi:10.1007/s00044-022-02924-9>
145. Zubris, D.L.; Minbiole, K.P.C.; Wuest, W.M. Polymeric Quaternary Ammonium Compounds: Versatile Antimicrobial Materials. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017.**, *17*, 305–318. <https://doi:10.2174/1568026616666160829155805>
146. Sharma, S.; Mohler, J.; Mahajan, S.D.; Schwartz, S.A.; Bruggemann, L.; Aalinkeel, R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms* **2023.**, *11*, 1–33. <https://doi:10.3390/microorganisms11061614>
147. Fuda, C.; Suvorov, M.; Vakulenko, S.B.; Mobashery, S. The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *J. Biol. Chem.* **2004.**, *279*, 40802–40806. <https://doi:10.1074/jbc.M403589200>
148. Duran, N.; Temiz, M.; Duran, G.G.; Eryılmaz, N.; Jenedi, K. Relationship between the Resistance Genes to Quaternary Ammonium Compounds and Antibiotic Resistance in Staphylococci Isolated from Surgical Site Infections. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2014.**, *20*, 544–550. <https://doi:10.12659/MSM.890177>
149. Schlech, W.F. Epidemiology and Clinical Manifestations of Listeria Monocytogenes Infection. *Gram-Positive Pathog.* **2019.**, *7*, 793–802. <https://doi:10.1128/9781683670131.ch50>

150. Pérez, J.M.H.; Hernández, R.L.; Gil, P.U. Nosocomial Infection Caused by *Listeria Monocytogenes* in a Patient with a Lung Transplant. *Arch. Bronconeumol.* **2008.**, *44*, 645–7. [https://doi.org/10.1016/S1579-2129\(08\)60121-4](https://doi.org/10.1016/S1579-2129(08)60121-4)
151. Elsner, H.A.; Tenschert, W.; Fischer, L.; Kaulfers, P.M. Nosocomial Infections by *Listeria Monocytogenes*: Analysis of a Cluster of Septicemias in Immunocompromised Patients. *Infection* **1997.**, *25*, 135–139. <https://doi.org/10.1007/BF02113599>
152. Morrison, K.R.; Allen, R.A.; Minbiole, K.P.C.C.; Wuest, W.M. More QACs, More Questions: Recent Advances in Structure Activity Relationships and Hurdles in Understanding Resistance Mechanisms. *Tetrahedron Lett.* **2019.**, *60*, 150935. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.07.026>
153. Rhee, K.Y.; Gardiner, D.F. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Activity in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis.* **2004.**, *39*, 755–756. <https://doi.org/10.1086/422881>
154. Bernatová, S.; Samek, O.; Pilát, Z.; Serý, M.; Ježek, J.; Jákl, P.; Siler, M.; Krzyžánek, V.; Zemánek, P.; Holá, V.; et al. Following the Mechanisms of Bacteriostatic versus Bactericidal Action Using Raman Spectroscopy. *Molecules* **2013.**, *18*, 13188–13199. <https://doi.org/10.3390/molecules181113188>
155. Kwaśniewska, D.; Chen, Y.-L.L.; Wieczorek, D. Biological Activity of Quaternary Ammonium Salts and Their Derivatives. *Pathogens* **2020.**, *9*, 1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060459>
156. Knauf, G.A.; Cunningham, A.L.; Kazi, M.I.; Riddington, I.M.; Crofts, A.A.; Cattoir, V.; Trent, M.S.; Davies, B.W. Exploring the Antimicrobial Action of Quaternary Amines against *Acinetobacter Baumannii*. *MBio* **2018.**, *9*, e02394-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02394-17>
157. Grkovic, S.; Brown, M.H.; Roberts, N.J.; Paulsen, I.T.; Skurray, R.A. QacR Is a Repressor Protein That Regulates Expression of the *Staphylococcus Aureus* Multidrug Efflux Pump QacA. *J. Biol. Chem.* **1998.**, *273*, 18665–18673. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18665>
158. Takeuchi, K.; Imai, M.; Shimada, I. Conformational Equilibrium Defines the Variable Induction of the Multidrug-Binding Transcriptional Repressor QacR. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

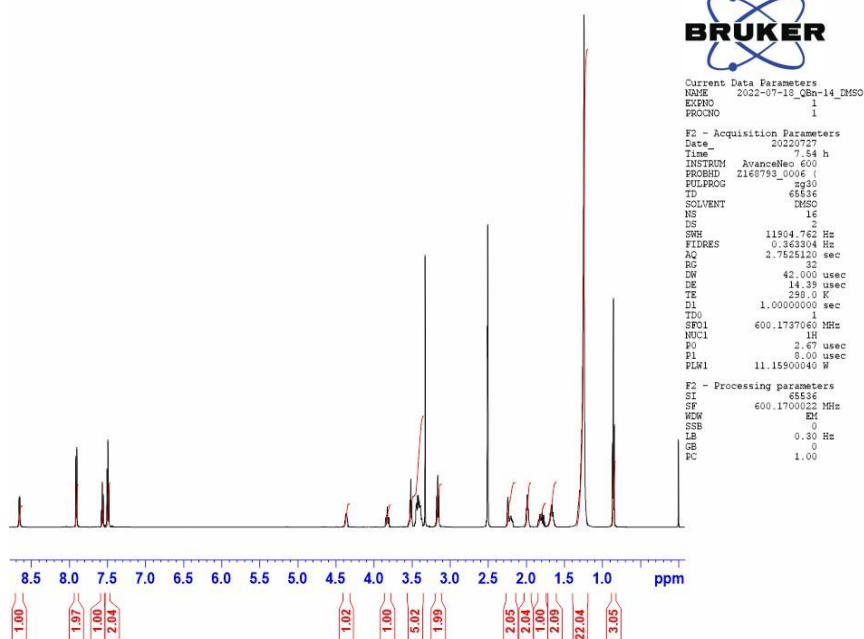
- U. S. A. **2019.**, *116*, 19963–19972. <https://doi:10.1073/pnas.1906129116>
159. Schumacher, M.A.; Miller, M.C.; Grkovic, S.; Brown, M.H.; Skurray, R.A.; Brennan, R.G. Structural Mechanisms of QacR Induction and Multidrug Recognition. *Science*. **2001.**, *294*, 2158. <https://doi:10.1126/science.1066020>
160. Schumacher, M.A.; Brennan, R.G. Structural Mechanisms of Multidrug Recognition and Regulation by Bacterial Multidrug Transcription Factors. *Mol. Microbiol.* **2002.**, *45*, 885–893. <https://doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03039.x>
161. Schumacher, M.A.; Miller, M.C.; Grkovic, S.; Brown, M.H.; Skurray, R.A.; Brennan, R.G. Structural Basis for Cooperative DNA Binding by Two Dimers of the Multidrug-Binding Protein QacR. *EMBO J.* **2002.**, *21*, 1210–1218. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1210>
162. Peters, K.M.; Brooks, B.E.; Schumacher, M.A.; Skurray, R.A.; Brennan, R.G.; Brown, M.H. A Single Acidic Residue Can Guide Binding Site Selection but Does Not Govern QaCR Cationic-Drug Affinity. *PLoS One* **2011.**, *6*, e15974. <https://doi:10.1371/journal.pone.0015974>
163. Barratt, E.; Bingham, R.J.; Warner, D.J.; Laughton, C.A.; Phillips, S.E.V.; Homans, S.W. Van Der Waals Interactions Dominate Ligand-Protein Association in a Protein Binding Site Occluded from Solvent Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2005.**, *127*, 11827–11834. <https://doi:10.1021/ja0527525>
164. Sikirić, M.; Primožič, I.; Filipović-Vinceković, N. Adsorption and Association in Aqueous Solutions of Dissymmetric Gemini Surfactant. *J. Colloid Interface Sci.* **2002.**, *250*, 221–229. <https://doi:10.1006/jcis.2002.8304>
165. Bošković, P.; Sokol, V.; Tomaš, R.; Prkić, A. Conductometric Study of Potassium Chloride in Ethanol-Water Mixtures. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013.**, *8*, 10961–10975. [https://doi:10.1016/s1452-3981\(23\)13162-2](https://doi:10.1016/s1452-3981(23)13162-2)
166. Zhao, Z.; Guo, X.; Jia, L.; Liu, Y. Synthesis and Properties of Quaternary Ammonium Surfactants Containing a Methoxy Benzyl Substitute. *RSC Adv.* **2014.**, *4*, 56918–56925. <https://doi:10.1039/c4ra07363k>
167. Pérez, L.; Pinazo, A.; Pons, R.; Infante, M. Gemini Surfactants from Natural Amino Acids. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014.**, *205*, 134–155. <https://doi:10.1016/j.cis.2013.10.020>

168. Durand-Vidal, S.; Bernard, O.; Medoš, Ž.; Bešter-Rogač, M. Theoretical Interpretation of Conductivity Data below and above the CMC: The Case of Alkaline Ion Decanoate Solutions. *J. Mol. Liq.* **2020.**, *309*, 112968. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112968>
169. Bošković, P.; Šprung, M.; Bazina, L.; Soldo, B.; Odžak, R. The Aggregation Behavior and Antioxidative Activity of Amphiphilic Surfactants Based on Quinuclidin-3-Ol. *J. Surfactants Deterg.* **2020.**, *23*, 207–214. <https://doi:10.1002/jsde.12348>
170. Quagliotto, P.; Viscardi, G.; Barolo, C.; D'Angelo, D.; Barni, E.; Compari, C.; Duce, E.; Fiscaro, E. Synthesis and Properties of New Glucocationic Surfactants: Model Structures for Marking Cationic Surfactants with Carbohydrates. *J. Org. Chem.* **2005.**, *70*, 9857–9866. <https://doi:10.1021/jo051579s>
171. Pisárčik, M.; Bajcura, M.; Lukáč, M.; Devínsky, F.; Bilková, A.; Bilka, F.; Horváth, B. Self-Aggregation of Cationic Gemini Surfactants with Amide Groups in the Spacer and Variable Alkyl Chain Length. *Colloid Polym. Sci.* **2023.**, *301*, 1379–1392. <https://doi:10.1007/s00396-023-05154-6>
172. Hoque, J.; Gonuguntla, S.; Yarlagadda, V.; Aswal, V.K.; Haldar, J. Effect of Amide Bonds on the Self-Assembly of Gemini Surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014.**, *16*, 11279–11288. <https://doi:10.1039/c3cp55244f>
173. Jia, X.; Wei, R.; Xu, B.; Liu, H.; Xu, B.-C. Green Synthesis, Surface Activity, Micellar Aggregation, and Foam Properties of Amide Quaternary Ammonium Surfactants. *ACS Omega* **2022.**, *7*, 48240–48249. <https://doi:10.1021/acsomega.2c06353>
174. Kujawski, J.; Popielarska, H.; Myka, A.; Drabińska, B.; Bernard, M. The Log P Parameter as a Molecular Descriptor in the Computer-Aided Drug Design – an Overview. *Comput. Methods Sci. Technol.* **2012.**, *18*, 81–88. <https://doi:10.12921/cmst.2012.18.02.81-88>
175. Dahan, A.; Hoffman, A. Rationalizing the Selection of Oral Lipid Based Drug Delivery Systems by an in Vitro Dynamic Lipolysis Model for Improved Oral Bioavailability of Poorly Water Soluble Drugs. *J. Control. Release* **2008.**, *129*, 1–10. <https://doi:10.1016/j.jconrel.2008.03.021>
176. Otasevic, S.; Vojinovic, T. Lecithin and Anionic Lipids as an Imitation of the Lipid Membrane in Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) Blood -Brain

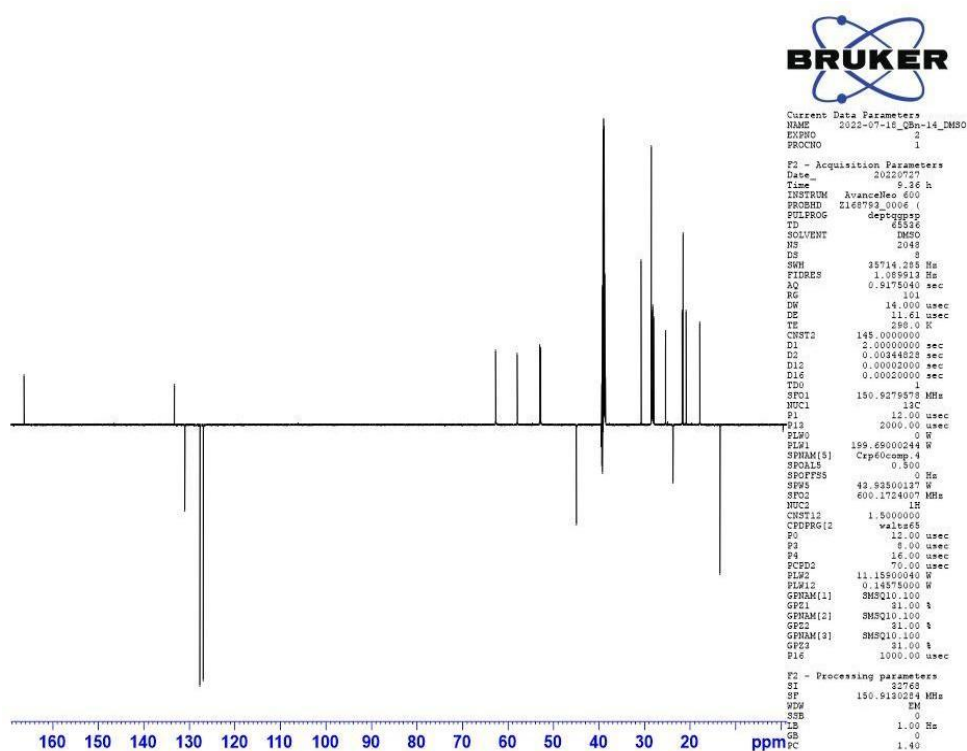
Barrier Models. *Prog. Nutr.* **2020.**, 22, 1–7. <https://doi:10.23751/pn.v22i3.9720>

177. Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J. Med. Chem.* **1998.**, 41, 1007–1010. <https://doi:10.1021/jm970530e>
178. Stiefel, P.; Schmidt-Emrich, S.; Maniura-Weber, K.; Ren, Q. Critical Aspects of Using Bacterial Cell Viability Assays with the Fluorophores SYTO9 and Propidium Iodide. *BMC Microbiol.* **2015.**, 15, 1–9. <https://doi:10.1186/s12866-015-0376-x>

Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana

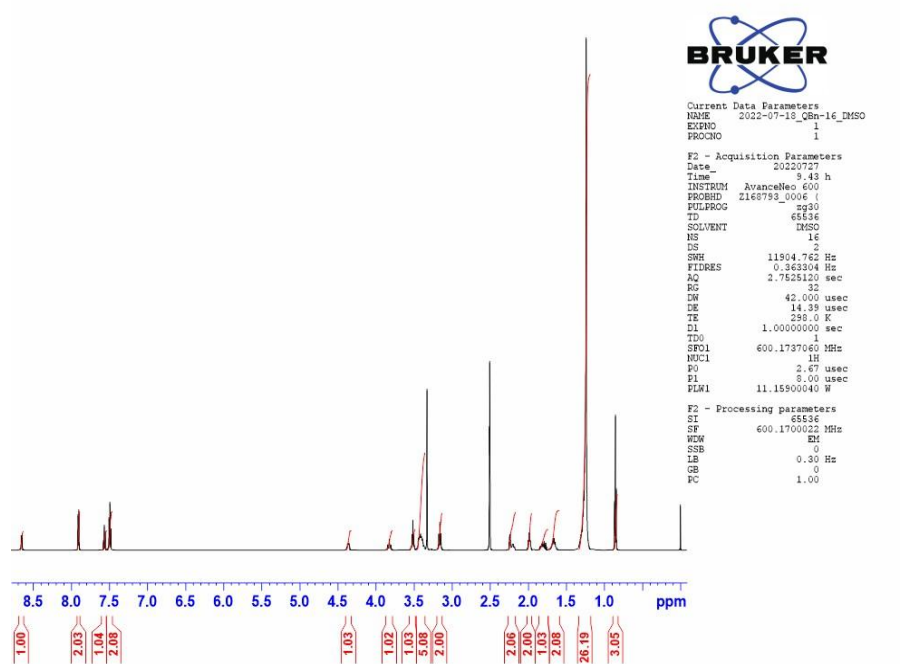


Slika 46. ^1H NMR spektar QBn- C_{14} .

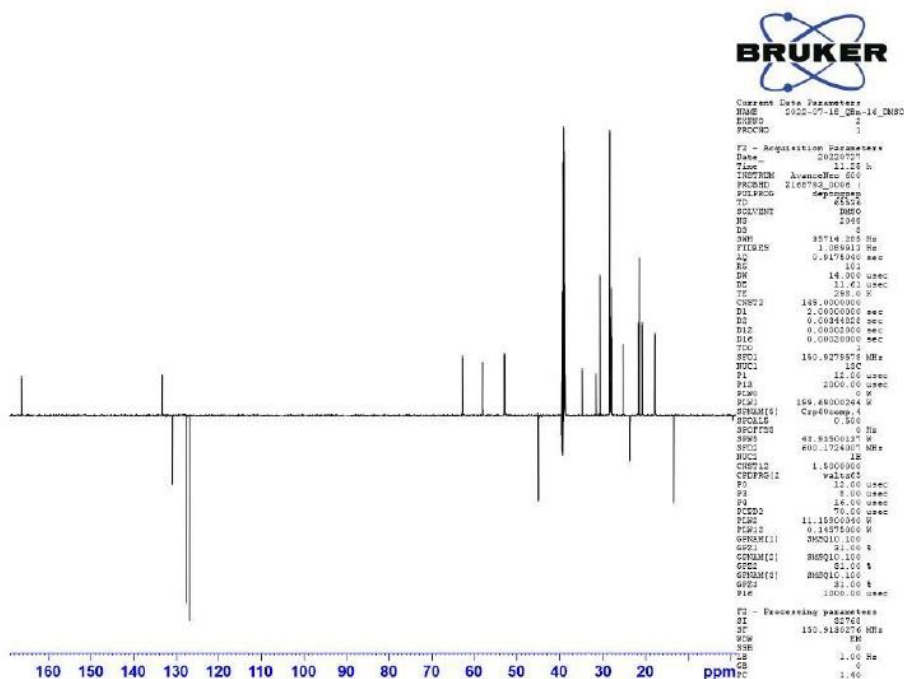


Slika 47. ^{13}C NMR spektar QBn- C_{14} .

Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana

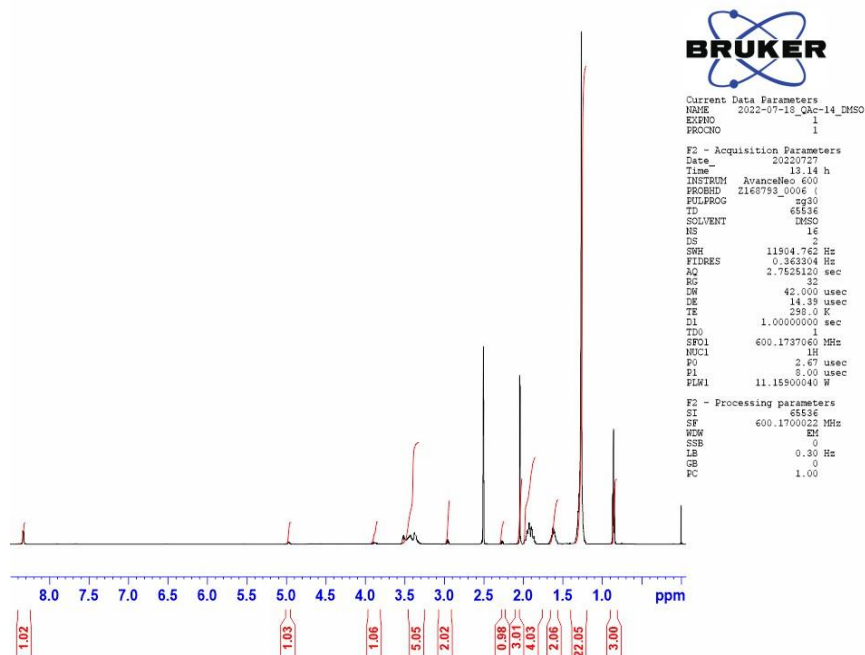


Slika 48. ^1H NMR spektar QBn- C_{16} .

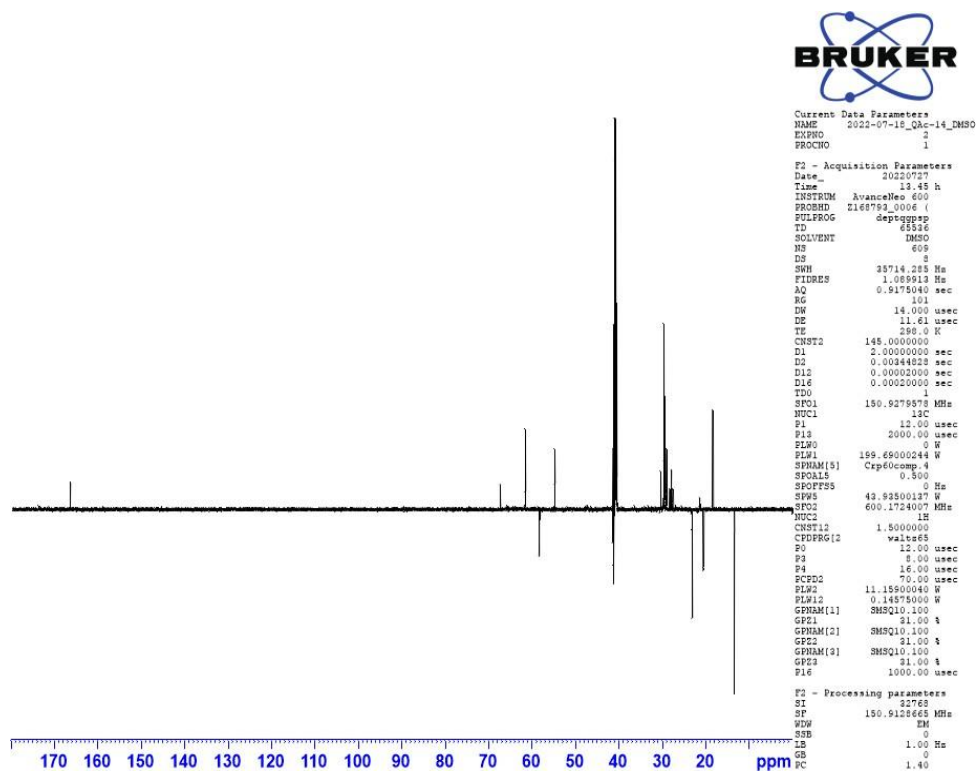


Slika 49. ^{13}C NMR spektar QBn- C_{16} .

Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana

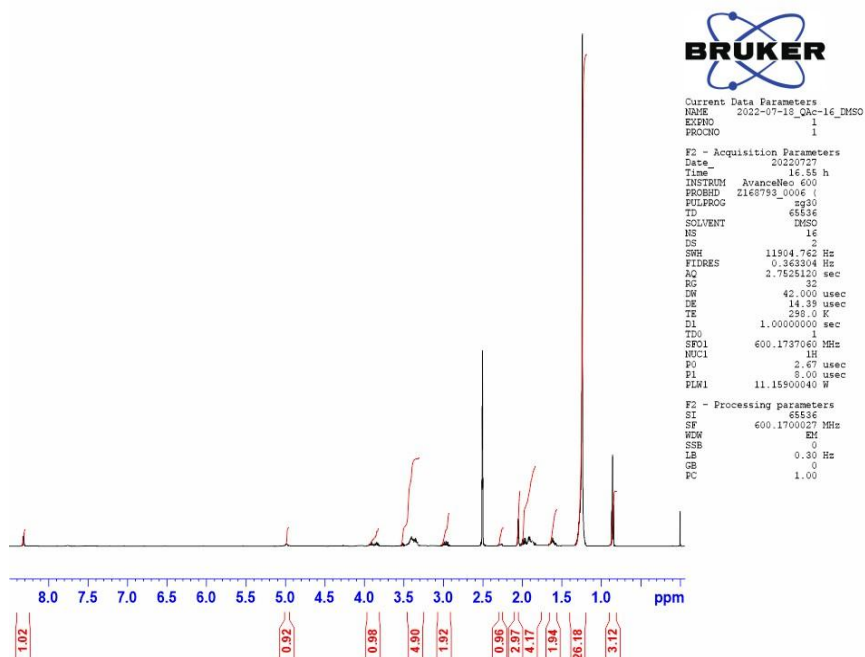


Slika 52. ^1H NMR spektar QAc- C_{14} .

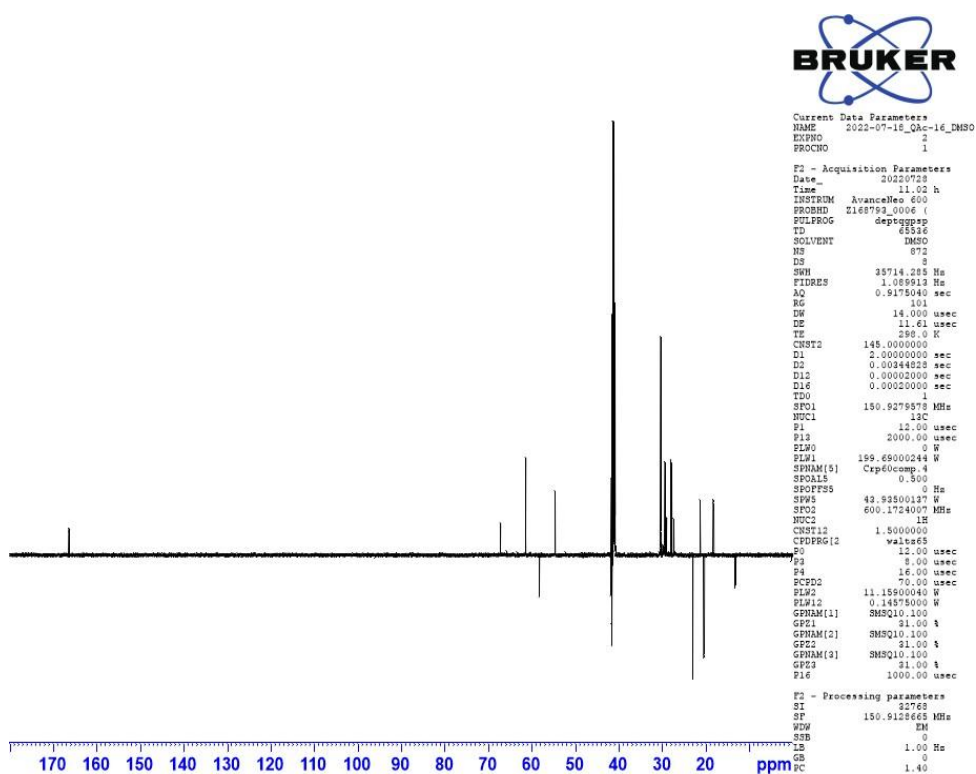


Slika 53. ^{13}C NMR spektar QAc- C_{14} .

Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana

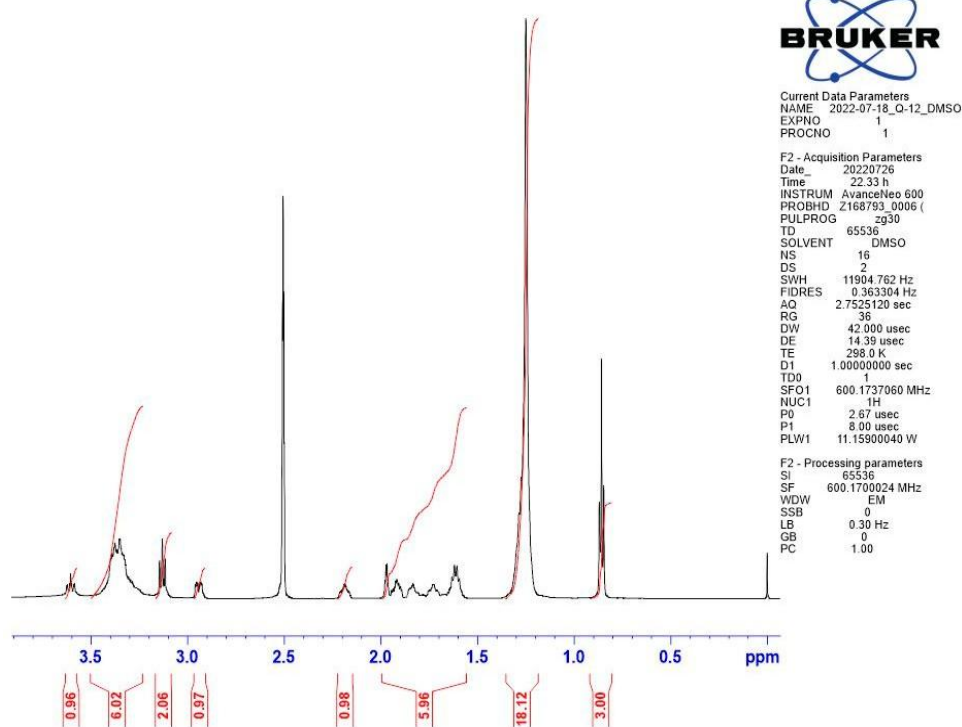


Slika 54. ^1H NMR spektar QAc- C_{16} .

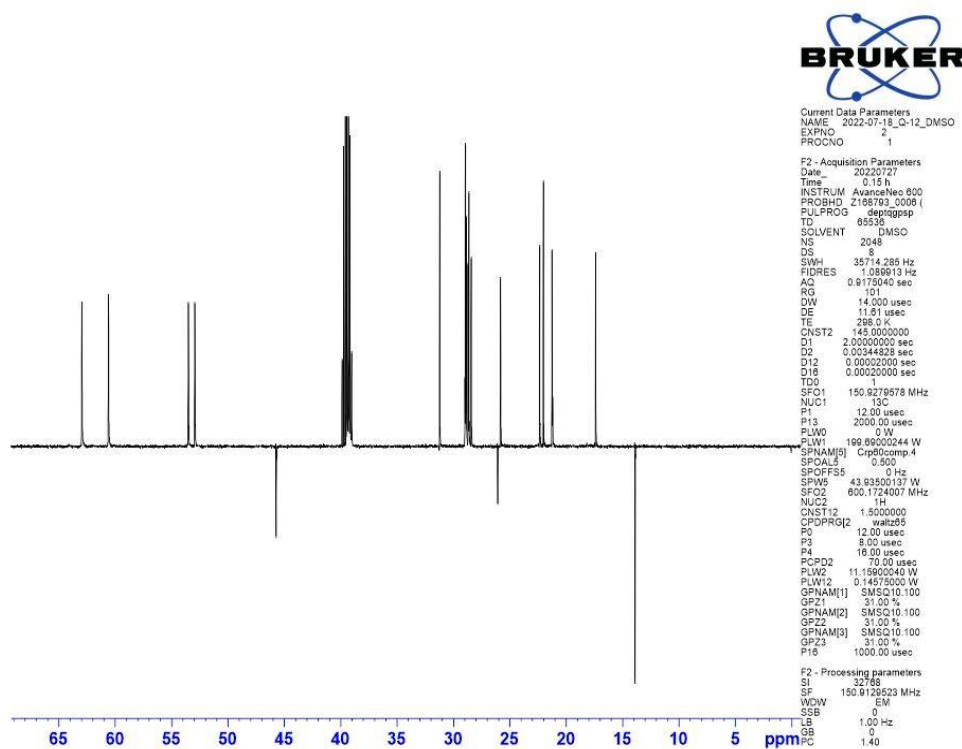


Slika 55. ^{13}C NMR spektar QAc- C_{16} .

Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana

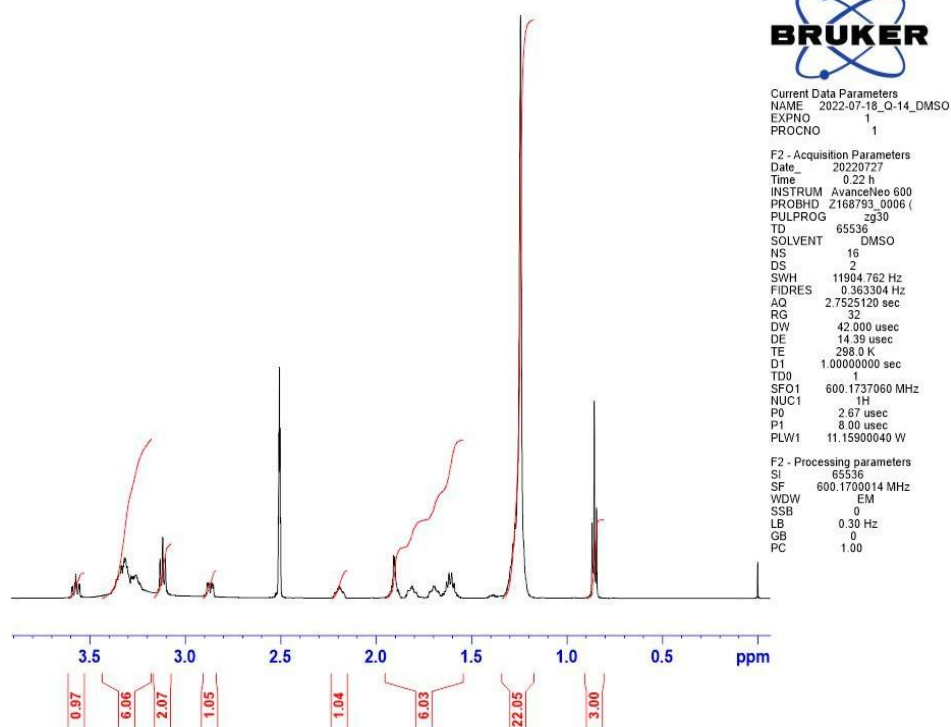


Slika 56. ^1H NMR spektar $\text{QNH}_2\text{-C}_{12}$.

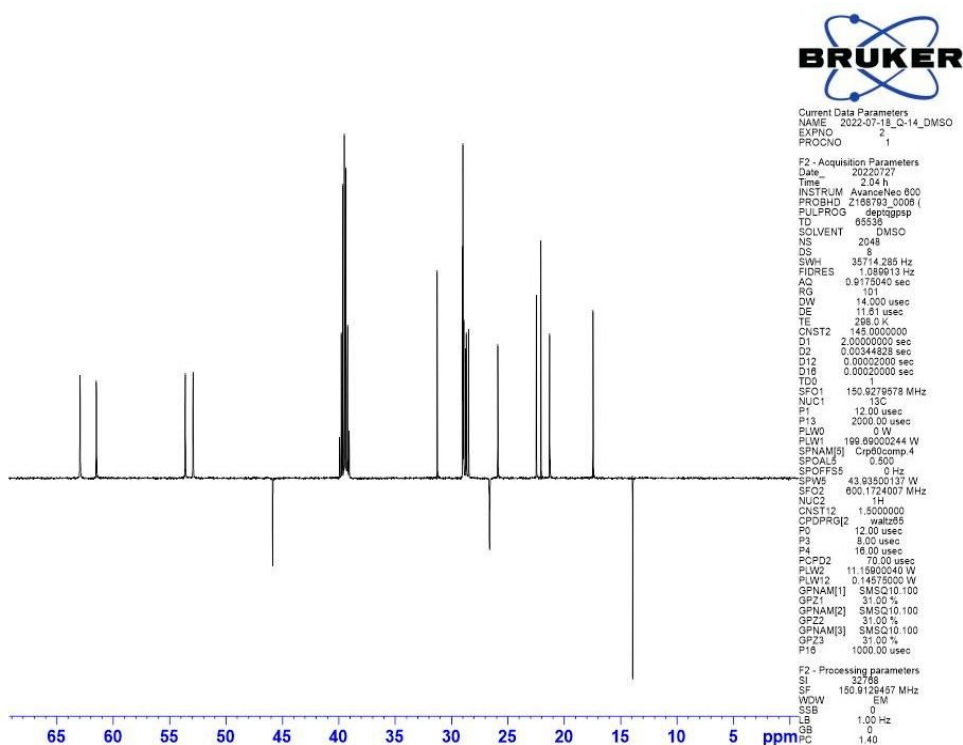


Slika 57. ^{13}C NMR spektar $\text{QNH}_2\text{-C}_{12}$.

Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana

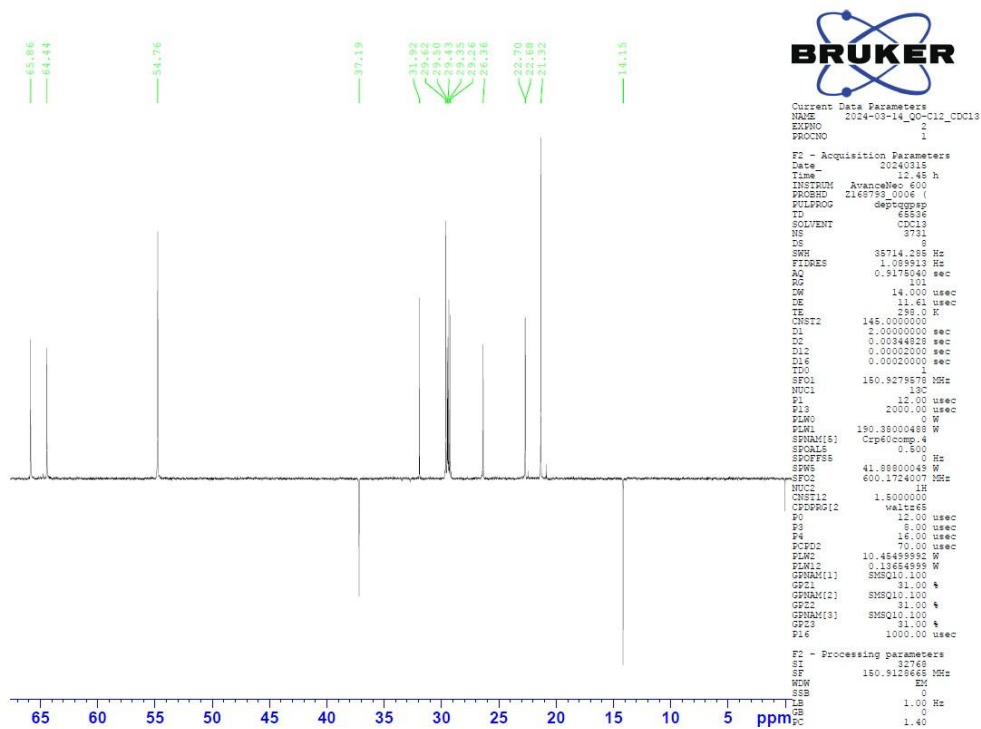


Slika 58. ^1H NMR spektar $\text{QNH}_2\text{-C}_{14}$.

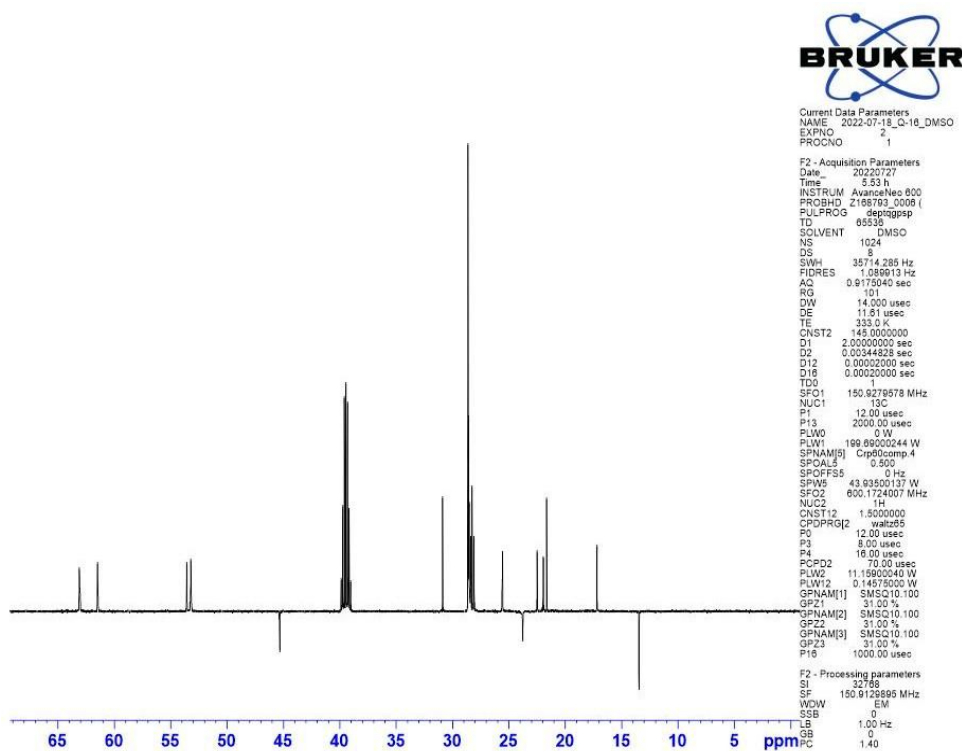


Slika 59. ^{13}C NMR spektar $\text{QNH}_2\text{-C}_{14}$.

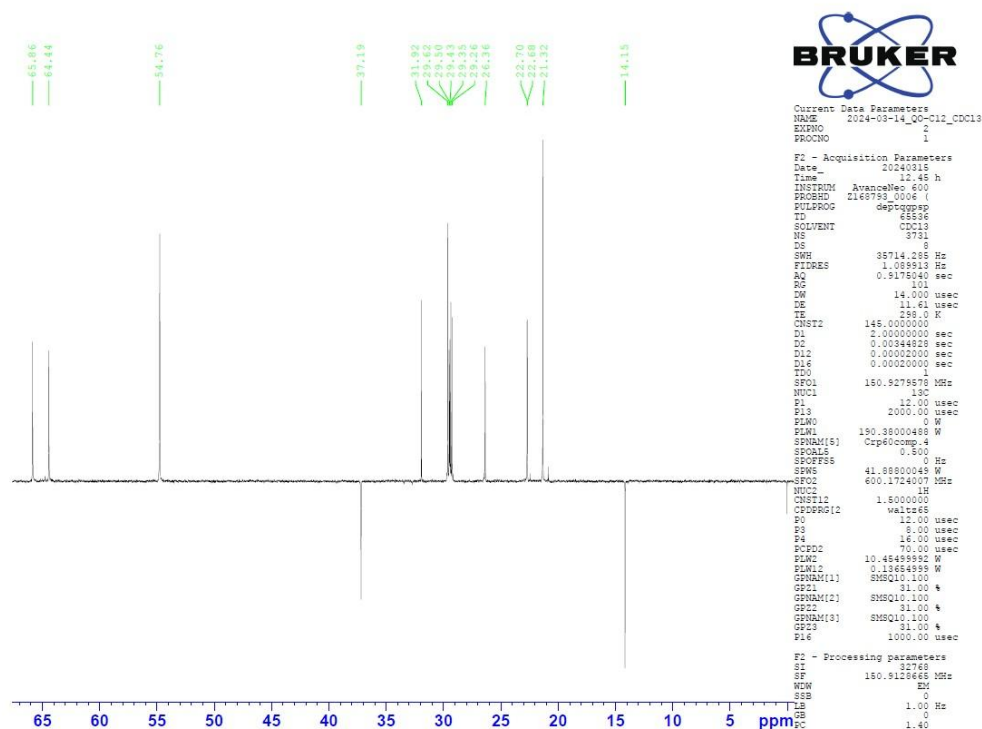
Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana



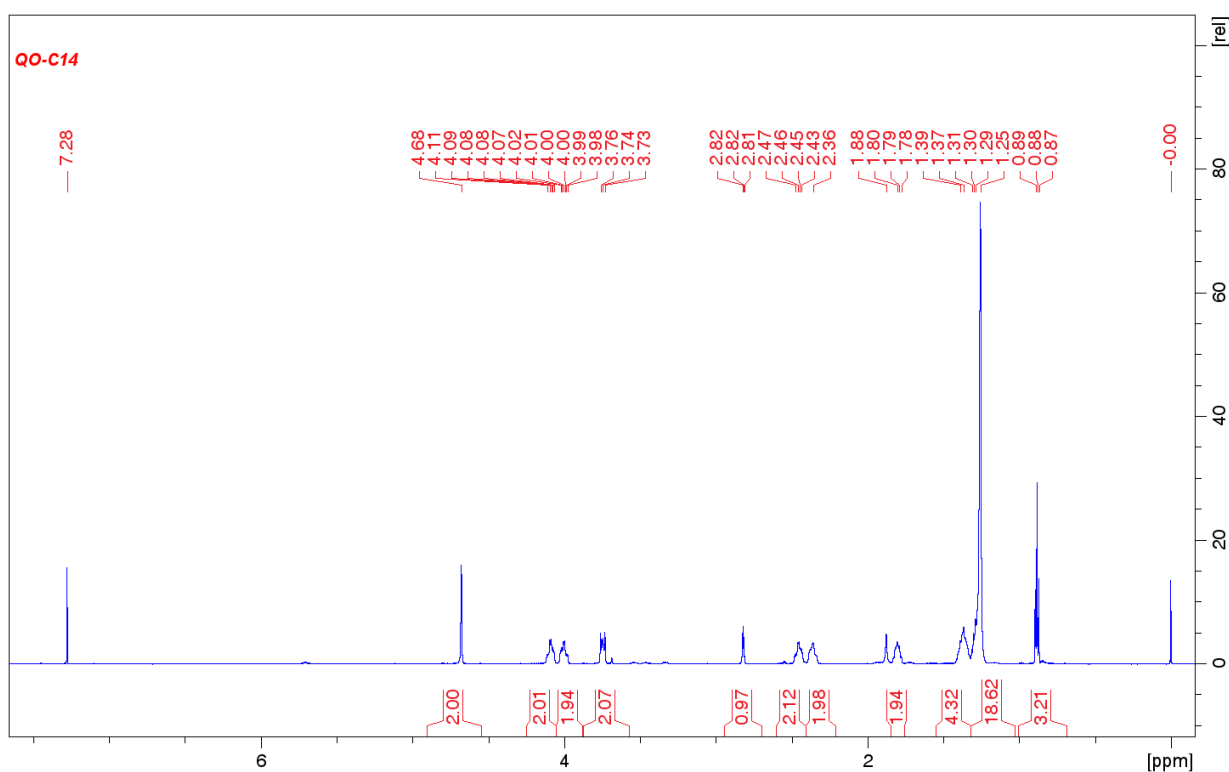
Slika 60. ^1H NMR spektar $\text{QNH}_2\text{-C}_{16}$.



Slika 61. ^{13}C NMR spektar $\text{QNH}_2\text{-C}_{16}$.

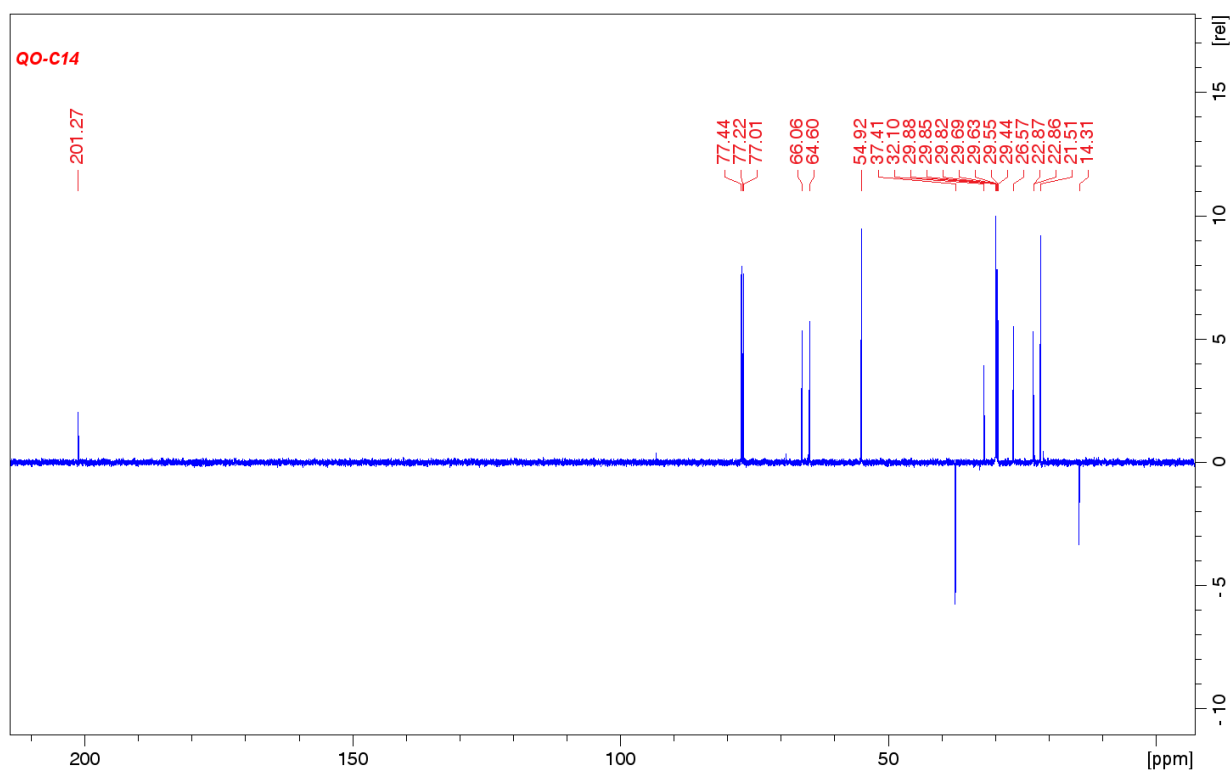


Slika 62. ^{13}C NMR spektar QO- C_{12} .

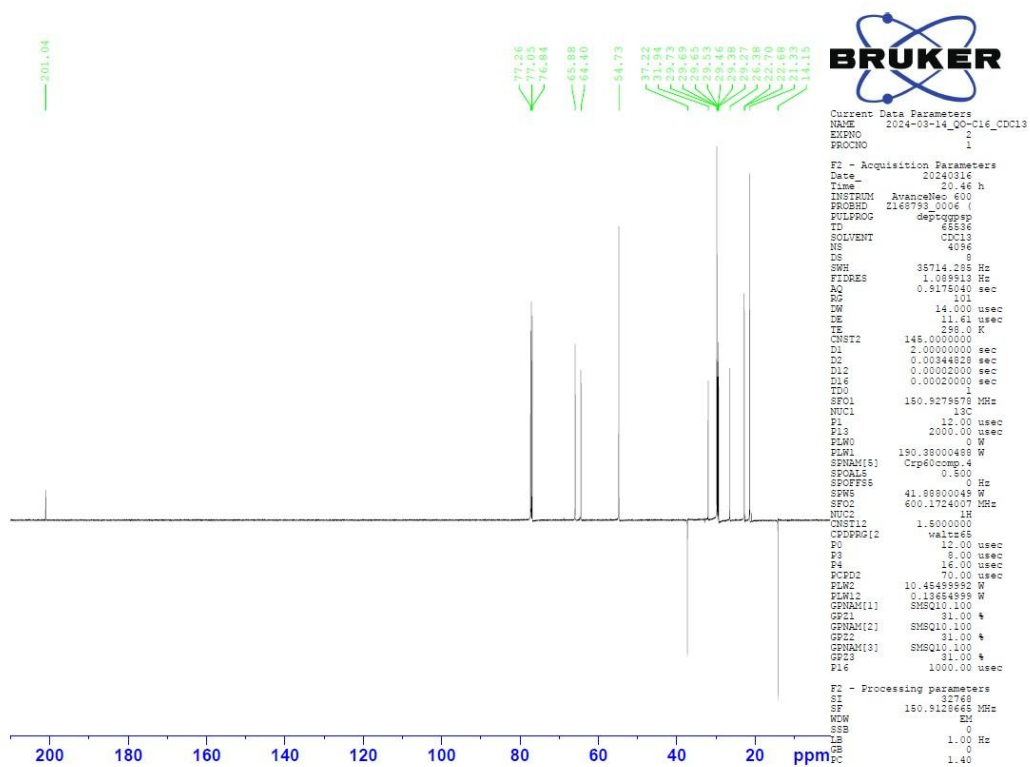


Slika 63. ^1H NMR spektar QO-C₁₄.

Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana

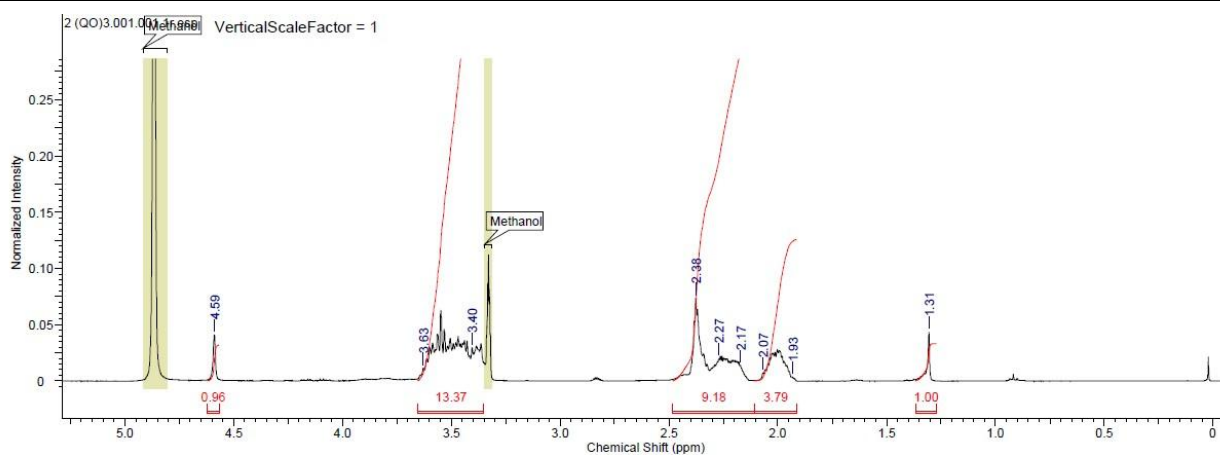


Slika 64. ^{13}C NMR spektar QO-C₁₄.

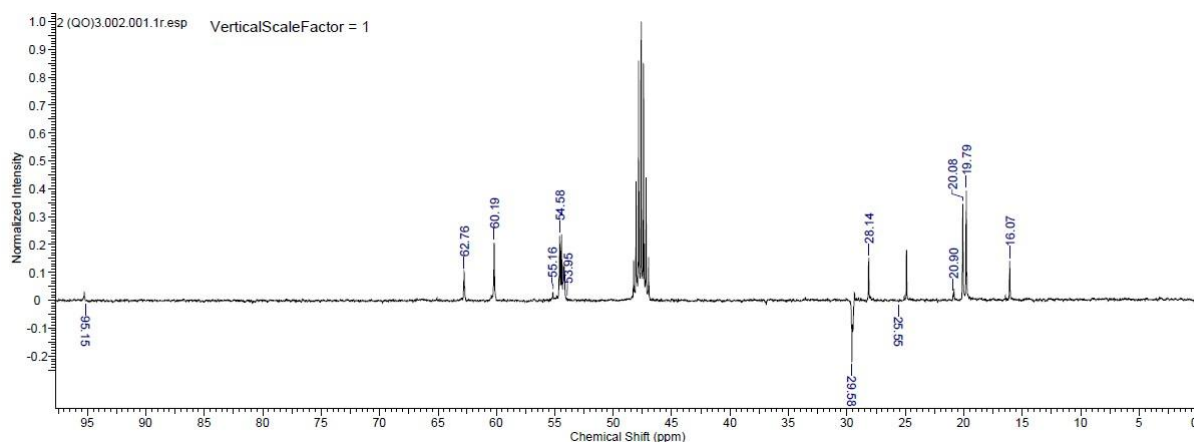


Slika 65. ^{13}C NMR spektar QO-C₁₆.

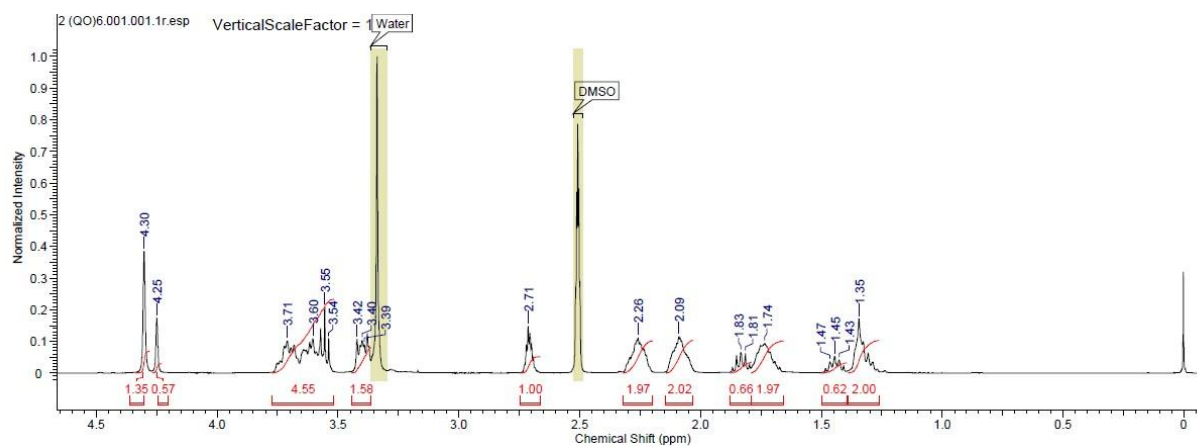
Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana



Slika 66. ^1H NMR spektar $2(\text{QO})_3$

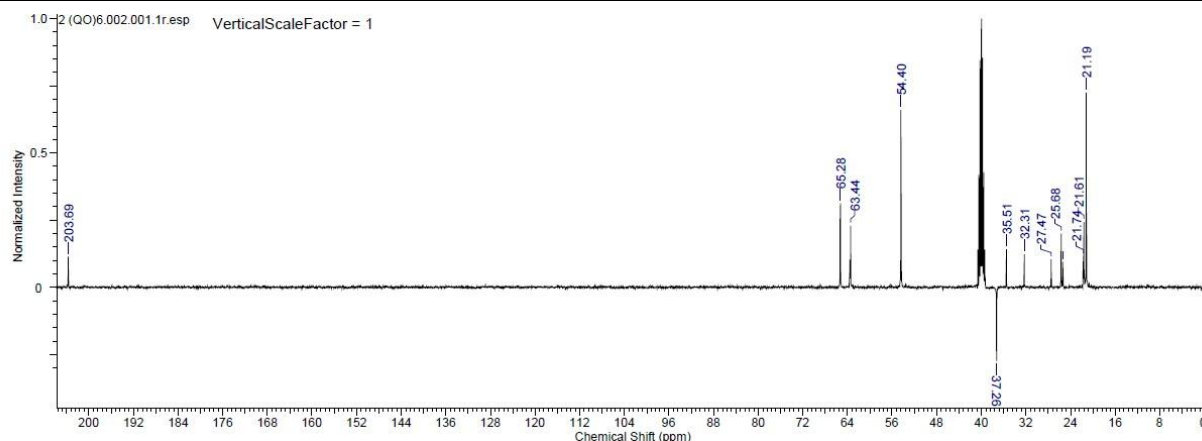


Slika 67. ^{13}C NMR $2(\text{QO})_3$.

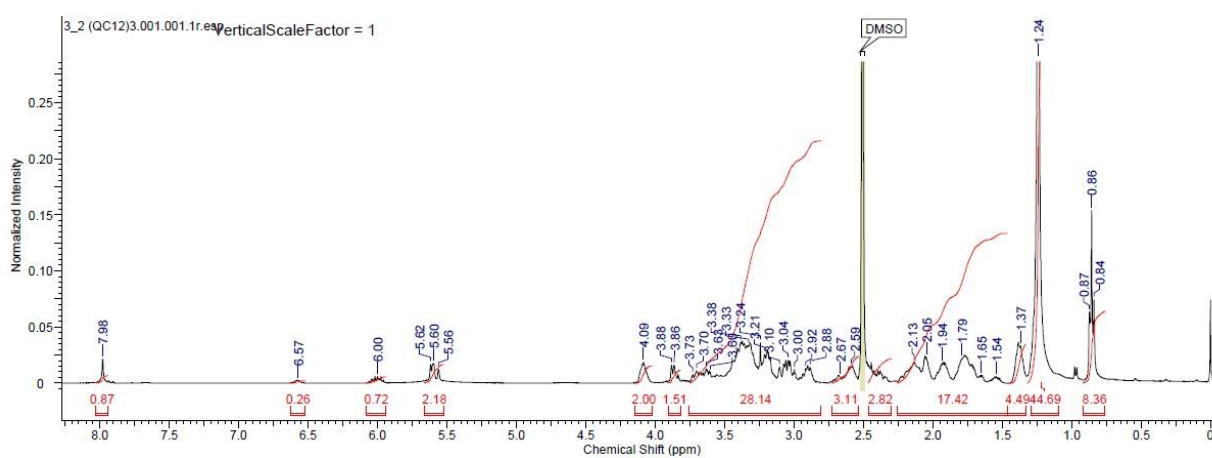


Slika 68. ^1H NMR spektar $2(\text{QO})_6$

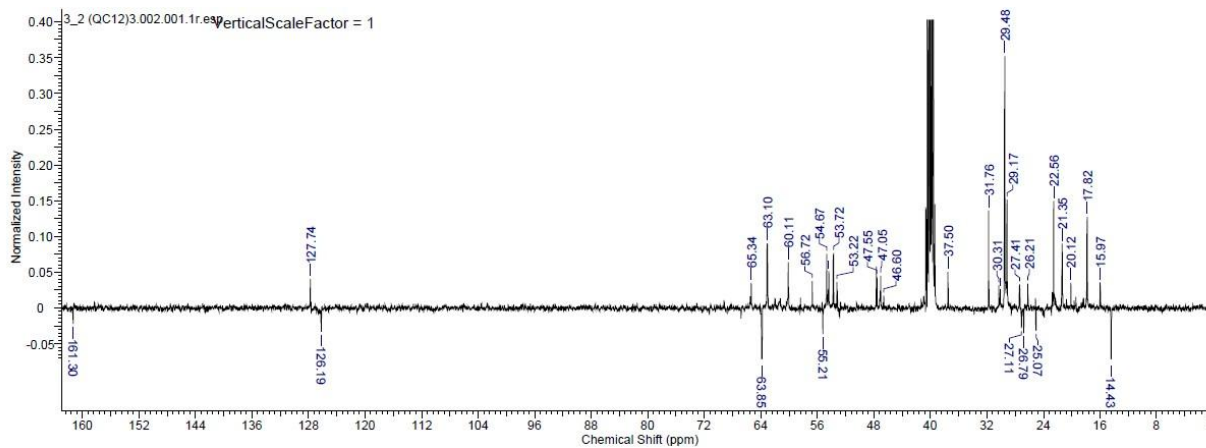
Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabiciklo[2.2.2] oktana



Slika 69. ^{13}C NMR 2(QO)₆.

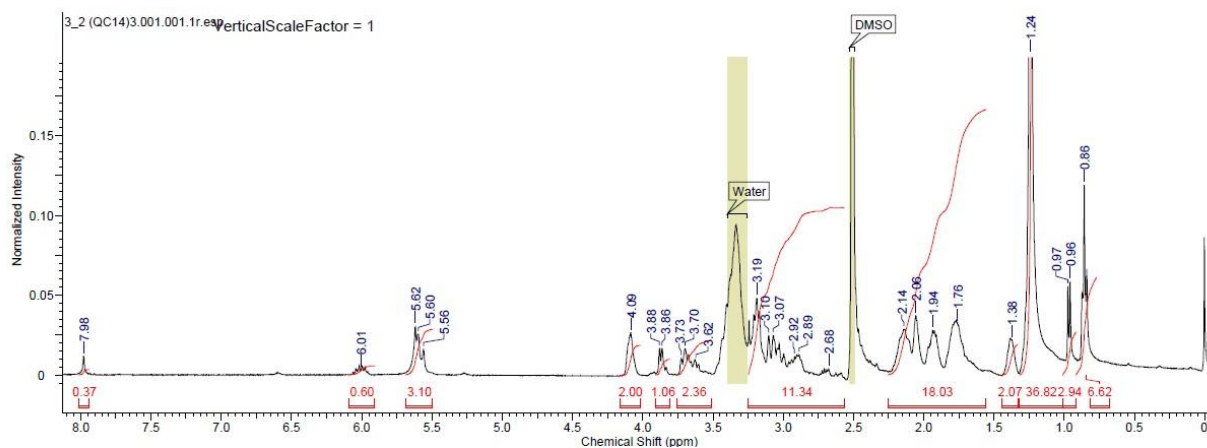


Slika 70. ^1H NMR 2(QC₁₂)₃.

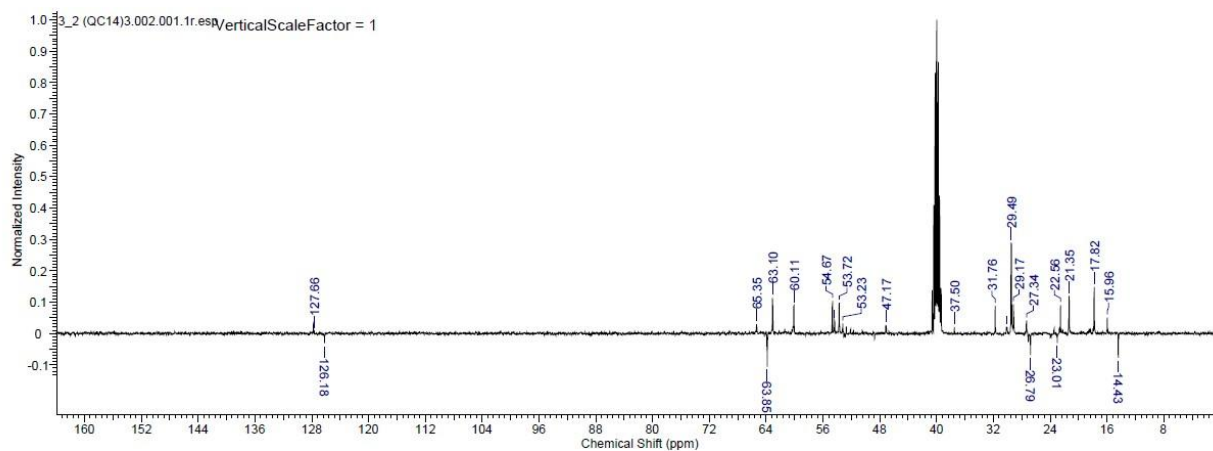


Slika 71. ^{13}C NMR 2(QC₁₂)₃.

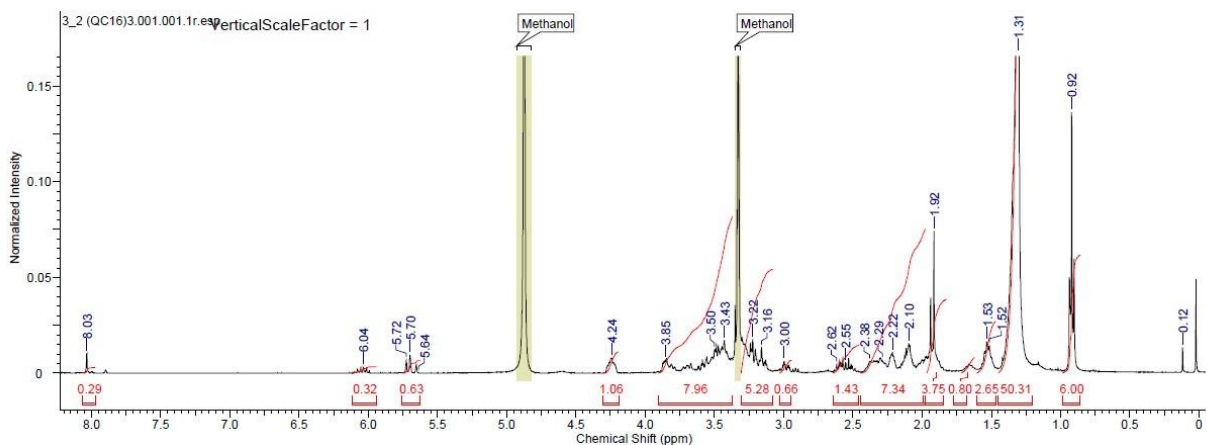
Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana



Slika 72. ^1H NMR $2(\text{QC}_{14})_3$.

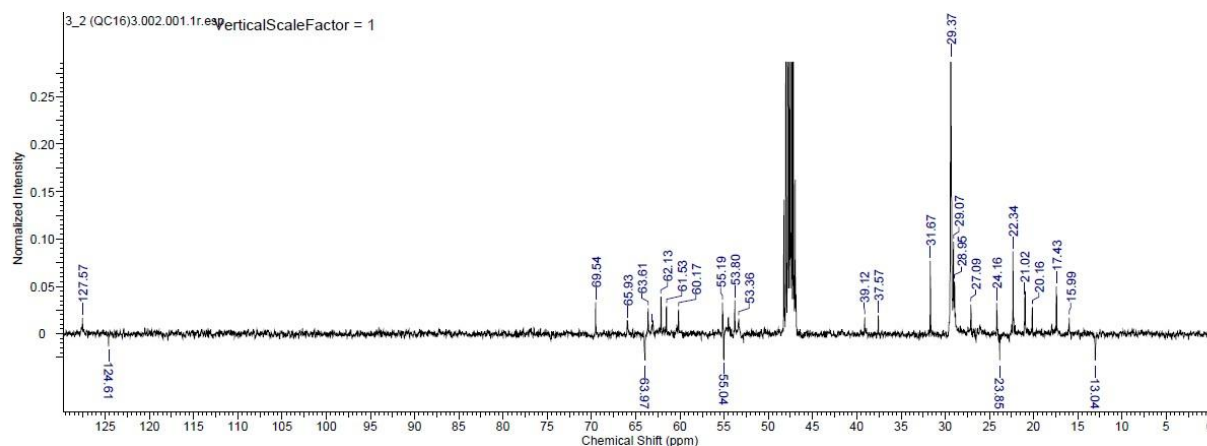


Slika 73. ^{13}C NMR $2(\text{QC}_{14})_3$.

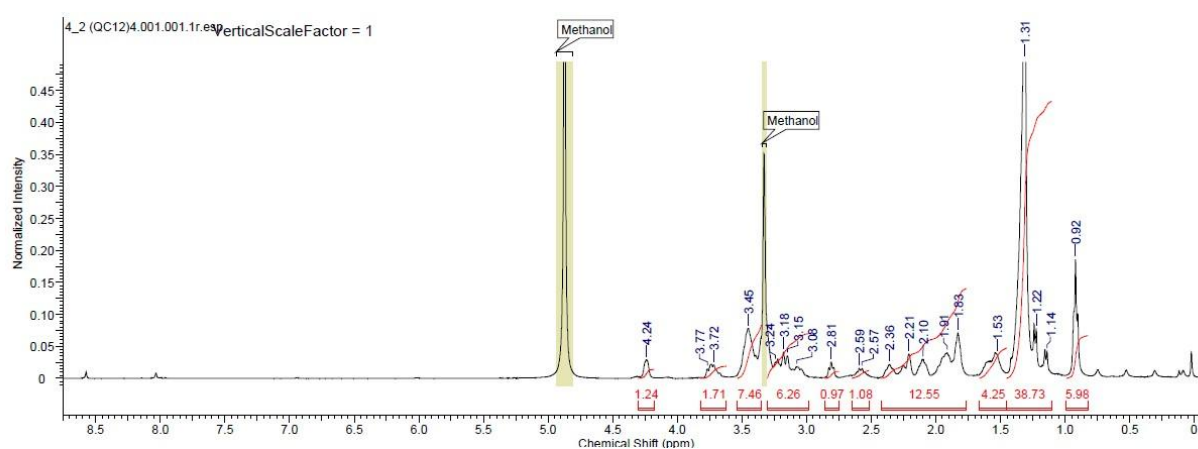


Slika 74. ^1H NMR $2(\text{QC}_{16})_3$.

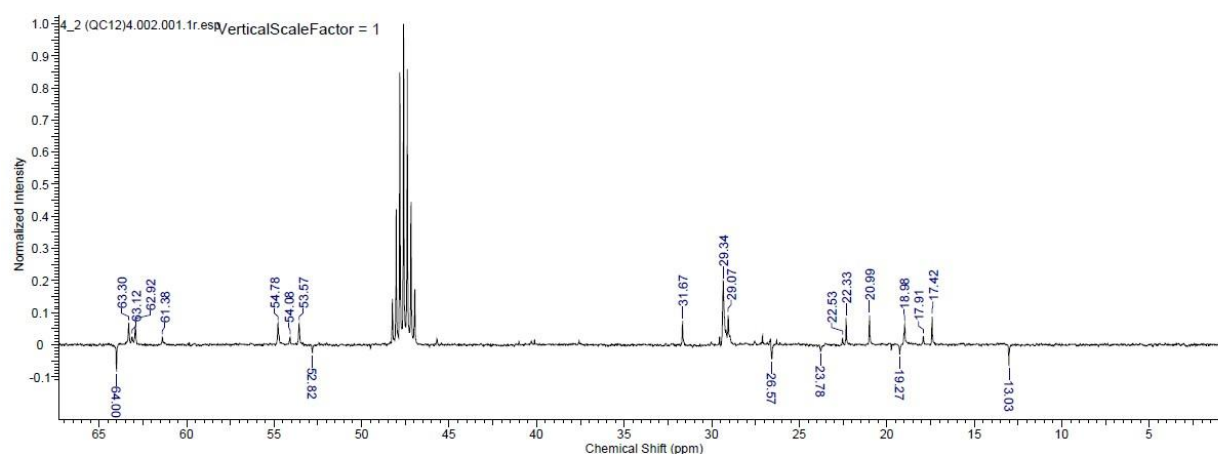
Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana



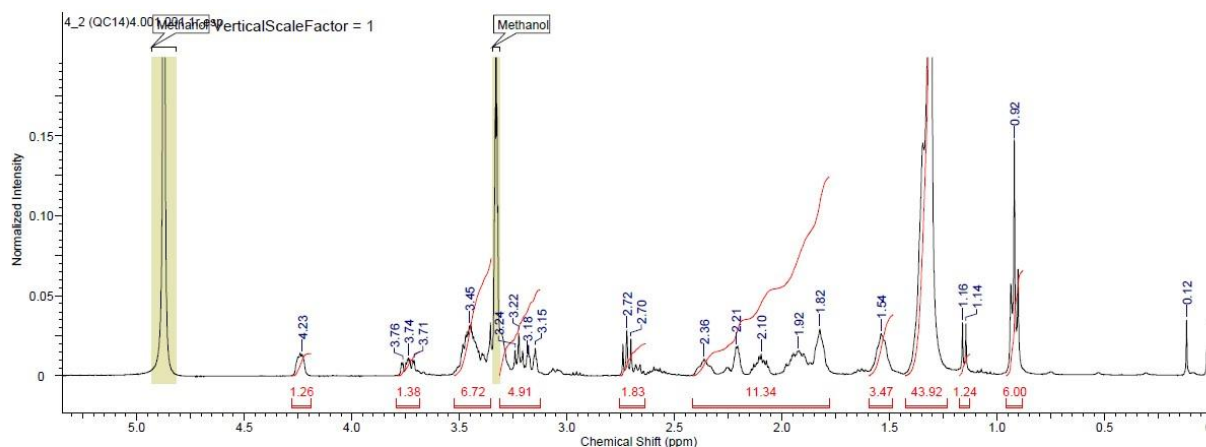
Slika 75. ¹³C NMR 2(QC₁₆)₃.



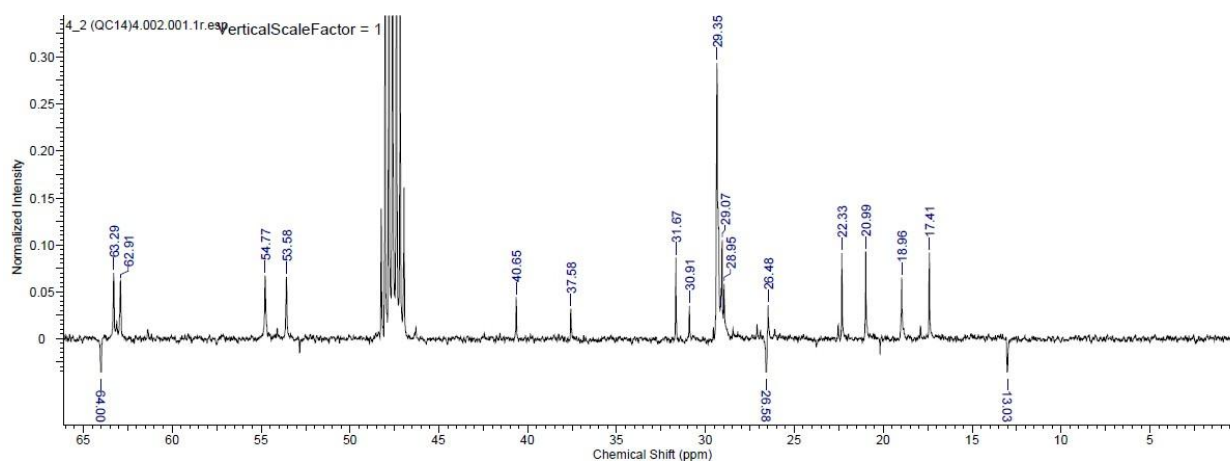
Slika 76. ¹H NMR 2(QC₁₂)₄.



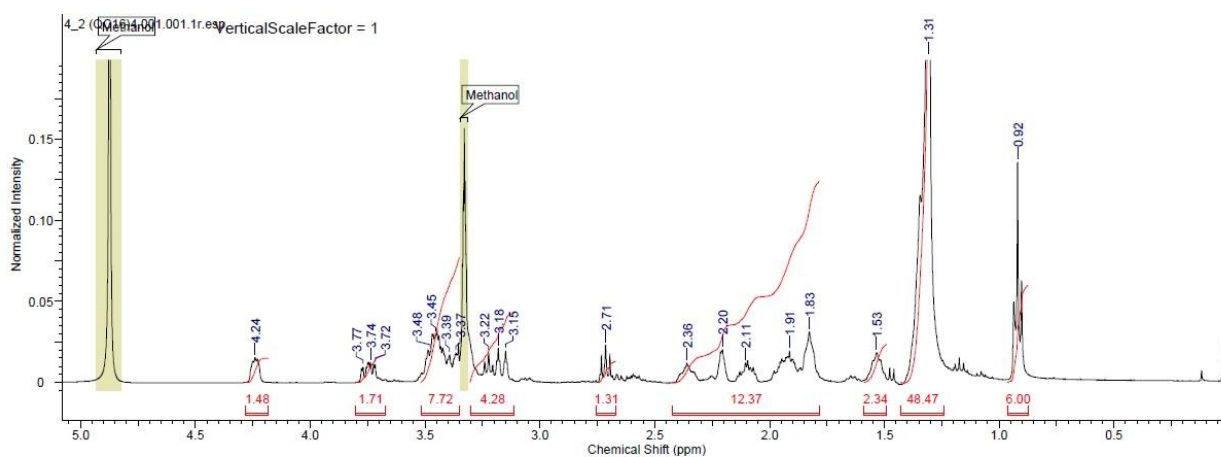
Slika 77. ¹³C NMR 2(QC₁₂)₄.



Slika 78. ^1H NMR 2(QC₁₄)₄.

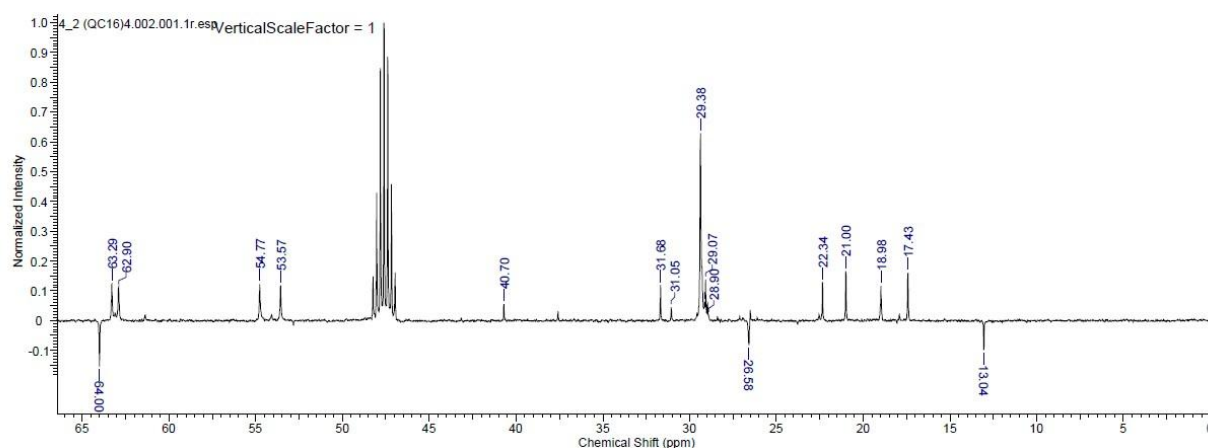


Slika 79. ^{13}C NMR 2(QC₁₄)₄.

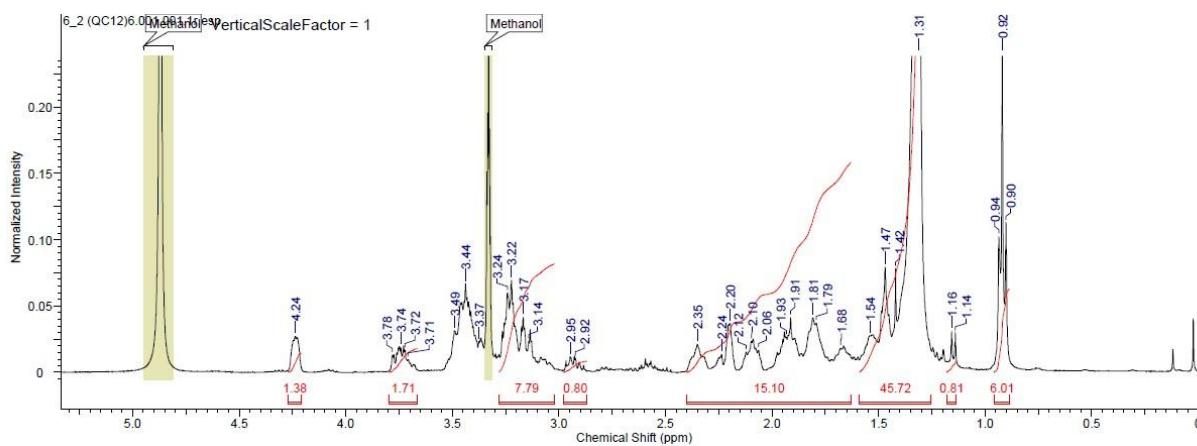


Slika 80. ^1H NMR 2(QC₁₆)₄.

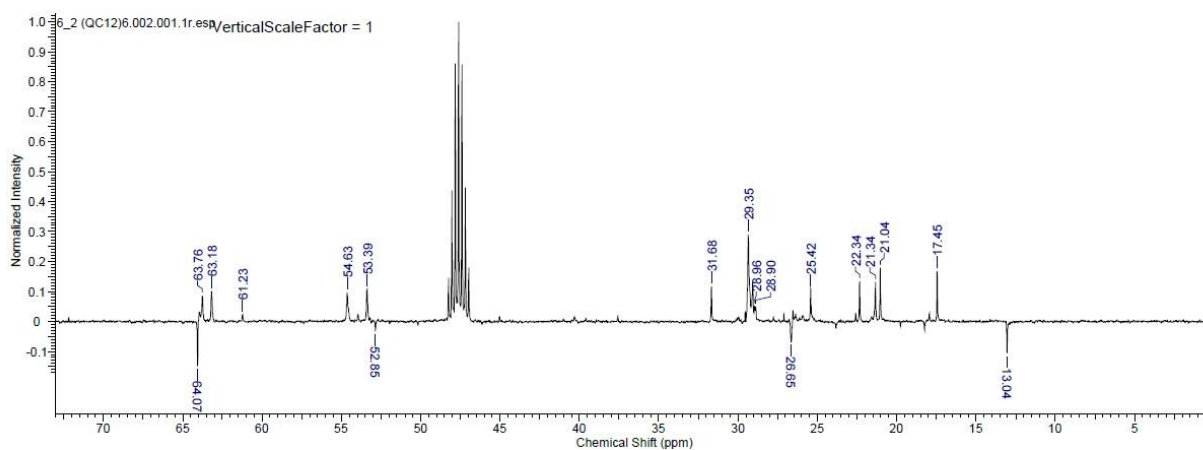
Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana



Slika 81. ^{13}C NMR 2(QC₁₆)₄.

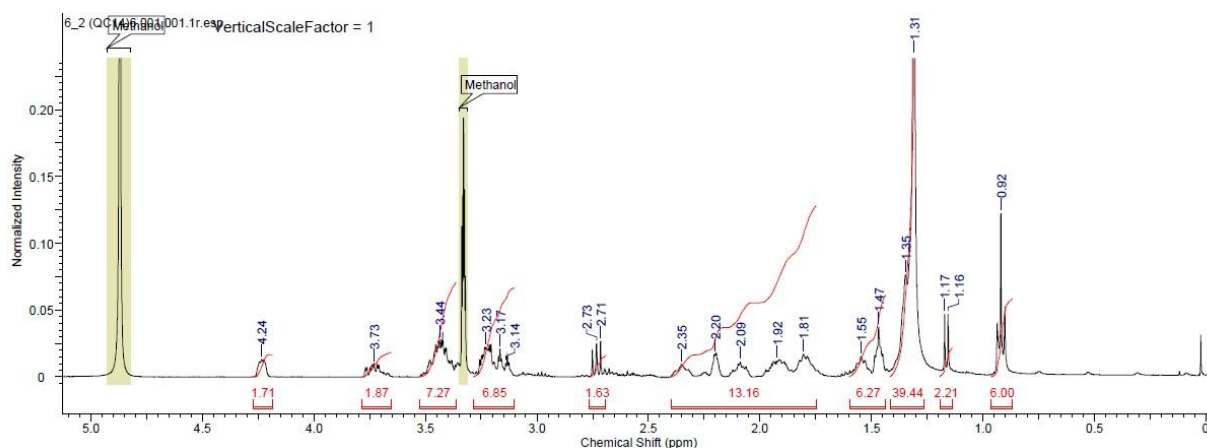


Slika 82. ^1H NMR 2(QC₁₂)₆.

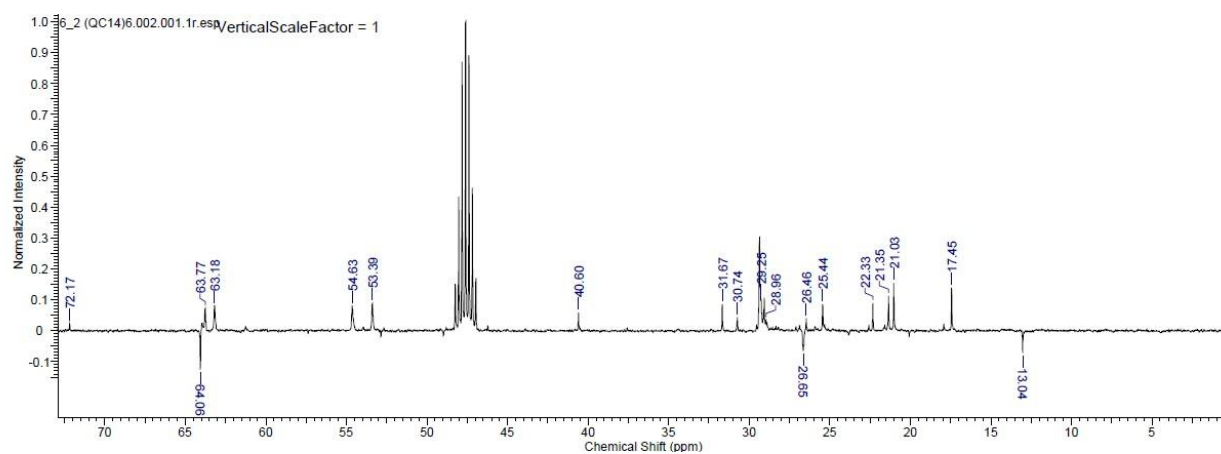


Slika 83. ^{13}C NMR 2(QC₁₂)₆.

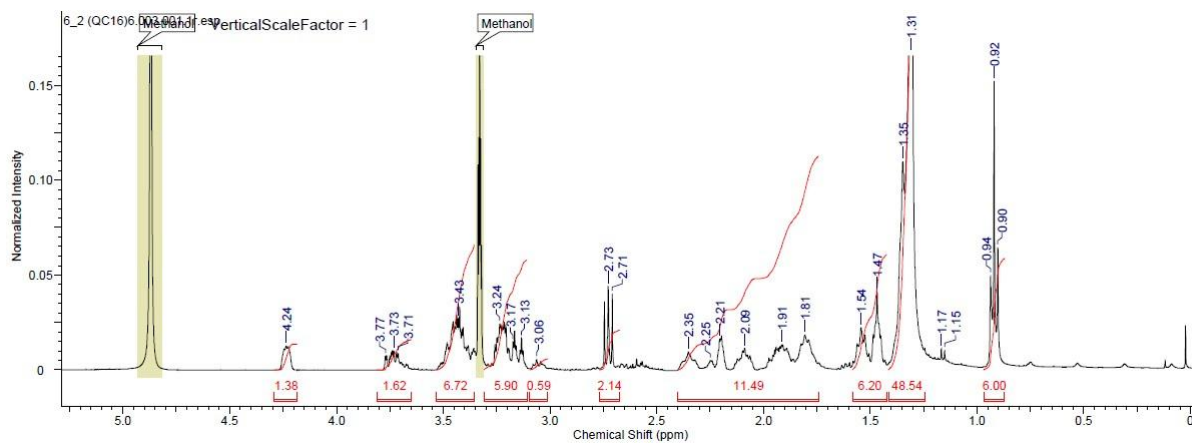
Sinteza i biološka aktivnost mono- i biskvaternih amonijevih spojeva na okosnici 1-azabicyklo[2.2.2] oktana



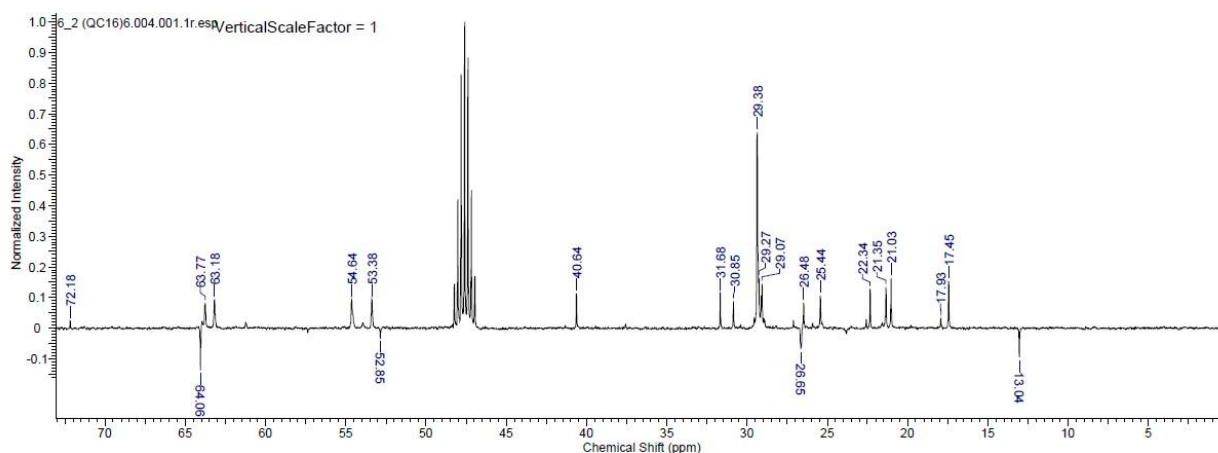
Slika 84. ¹H NMR 2(QC₁₄)₆.



Slika 85. ¹³C NMR 2(QC₁₄)₆.



Slika 86. ¹H NMR 2(QC₁₆)₆.



Slika 87. ^{13}C NMR 2(QC₁₆)₆.

Životopis

Rođen sam 9. lipnja 1996. godine u Đakovu, Republici Hrvatskoj, gdje sam odrastao i pohađao Osnovnu školu "Ivan Goran Kovačić", nakon koje upisujem srednju Ekonomsku školu „Braća Radić“. Preddiplomski sveučilišni studij kemije, na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku upisujem 2015. godine, a isti završavam obranom završnog rada „*Lijekovi u liječenju urolitijaze*“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Berislava Markovića 2018. godine. Akademске godine 2018./2019. upisujem diplomski sveučilišni studij kemije - istraživački smjer (*analitička kemija, biokemija te organska kemija*) na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomski rad „*Sinteza novih hidrazonskih derivata vitamina B6, piridin-4-karbaldehida i 2-kinolinkarbaldehida*“ iz sintetske organske kemije izradio sam na Zavodu za primijenjenu kemiju i ekologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku kod prof. dr. sc. Dajane Gašo-Sokač. Diplomski rad i diplomski ispit obranio sam s izvrsnim uspjehom 22. srpnja 2020. godine. Dobitnik nagrade Hrvatskog kemijskog društva za izvrsnost u studiranju te stipendije Zaklade Novo Sutra kao student Odjela za kemiju Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer. U razdoblju od 14. lipnja do 16. srpnja 2021. godine boravio sam kao vanjski suradnik na Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Split, u grupi za sintezu i biološka ispitivanja novih kvaternih amonijevih spojeva voditeljica prof. dr. sc. Renate Odžak i izv. prof. dr. sc. Matilde Šprung. U tom periodu boravka sudjelovao sam na radionici „*Simulacija Biomolekula (BioSim)*“ - molekularno modeliranje i računalne simulacije pri Sveučilišnom računalnom centru (SRCE) u Zagrebu, koja se održala na Odjelu za fiziku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu (PMFST). Od 20. rujna do 30. studenoga 2021. godine volontirao sam na Odjelu za kemiju PMFST. U prosincu 2021. godine se zapošljavam kao asistent na projektu Hrvatske zaklade za

znanost pod vodstvom mentorica izv. prof. dr. sc. Matilde Šprung i prof. dr. sc. Renate Odžak te upisujem prvu godinu poslijediplomskog doktorskog studija Biofizika na PMFST. Tijekom znanstveno-istraživačkog rada sudjelovao sam na nekoliko znanstvenih skupova kao koautor na posterskim priopćenjima iz područja teme doktorata, ali i radionicama iz:

- protočne citometrije na Medicinskom fakultetu Split (25. do 29. travnja 2022.)
- bioinformatike na Mediteranskom institutu za istraživanje života Split (29. kolovoza do 2. rujna 2022.)
- mikroskalarne termoforeze (MST) u Münchenu, Njemačka (3. do 4. srpnja 2023.),
- LC/MS analize proteina u BIOCentru – inkubacijski centar za bioznanost (30. kolovoza do 1. rujna 2023.)
- radionici iz masene spektrometrije u životnim znanostima na PMF Zagreb (19. do 21. rujna 2024.)

Znanstveni radovi:

1. Sabljčić, A.; Čarija, D.; Begić, K.; Odžak, R.; Čož-Rakovac, R.; Šprung, M. 3-Substituted Quinuclidine-Based Quaternary Ammonium Compounds: Potent and Resistance-Resilient Antibacterials Against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *J. Chem.* **2025.**, u tisku.
2. Sabljčić, A.; Čarija, D.; Ramić, A.; Šprung, M.; Odžak, R. Structure–Function Insights into Quinuclidine-3-One BisQACs: Synthesis, Modulation of Bacterial Resistance, Structure–Activity Relationship, and Biological Profiling. *Pharmaceuticals* **2025.**, *18*(9), 1286. <https://doi.org/10.3390/ph18091286>
3. Bartolić, M.; Matošević, A.; Maraković, N.; Bušić, V.; Roca, S.; Vikić-Topić, D.; Sabljčić, A.; Bosak, A.; Gašo-Sokač, D. Evaluation of Hydrazone and N-Acylhydrazone Derivatives of Vitamin B6 and Pyridine-4-Carbaldehyde as Potential Drugs against Alzheimer’s Disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2024.**, *39*(1), 2431832. <https://doi.org/10.1080/14756366.2024.2431832>
4. Odžak, R.; Crnčević, D.; Sabljčić, A.; Krce, L.; Paladin, A.; Primožič, I.; Šprung, M. Further Study of the Polar Group’s Influence on the Antibacterial Activity of the 3-Substituted

Quinuclidine Salts with Long Alkyl Chains. *Antibiotics* **2023.**, 12, 1231.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12081231>

5. Odžak, R.; Crnčević, D.; Sabljic, A.; Primožić, I.; Šprung, M. Synthesis and Biological Evaluation of 3-Amidoquinuclidine Quaternary Ammonium Compounds as New Soft Antibacterial Agents. *Pharmaceuticals* **2023.**, 16(2), 187.
<https://doi.org/10.3390/ph16020187>
6. Crnčević, D.; Kree, L.; Cvitković, M.; Brkljača, Z.; Sabljic, A.; Vuko, E.; Primožić, I.; Odžak, R.; Šprung, M. New Membrane Active Antibacterial and Antiviral Amphiphiles Derived from Heterocyclic Backbone of Pyridinium-4-Aldoxime. *Pharmaceuticals* **2022.**, 15(7), 775.
<https://doi.org/10.3390/ph15070775>

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

1. Odžak, R.; Sabljic, A.; Šprung, M. Quinuclidine BisQACs: Structure–Activity Relationship Analysis with Focus on Antimicrobial Resistance.
Knjiga sažetaka 29. hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera, Split, Hrvatska, 2025; Hrvatsko kemijsko društvo: Split, Hrvatska, **2025.**; str. 165.
2. Sabljic, A.; Šprung, M.; Odžak, R. Design and Synthesis of Soft Quaternary Ammonium Salts Based on 3-Aminoquinuclidine with Amide-Linked Alkyl Chains.
Knjiga sažetaka 29. hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera, Split, Hrvatska, **2025.**; Hrvatsko kemijsko društvo: Split, Hrvatska, **2025.**; str. 181.
3. Odžak, R.; Sabljic, A.; Šprung, M. Quaternary 3-Quinuclidinone Compounds: Potent Antibacterial Agents Against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.
Knjiga sažetaka 27. kongresa SCTM; Društvo kemičara i tehnologa Makedonije, ur.; Društvo kemičara i tehnologa Makedonije: Skopje, Sjeverna Makedonija, **2024.**; str. 141.
4. Sabljic, A.; Šprung, M.; Odžak, R. Natural Derived Mono- and bisQACs from Quinuclidine Backbone as an Alternative to Commercial Disinfectants.

- Knjiga sažetaka 2. radionice o masenoj spektrometriji u životnim znanostima; Novak, R.; Močibob, M.; i sur., ur.; Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu: Zagreb, Hrvatska, **2024.**; str. 42.
5. Šprung, M.; Crnčević, D.; Sabljčić, A.; Odžak, R. New Insights into Quaternary Ammonium Compounds: From Structure–Activity Optimization to Antibacterial Mode of Action.
Knjiga sažetaka IX EFMC međunarodnog simpozija o napretku u sintetskoj i medicinskoj kemiji; EFMC: Louvain-la-Neuve, Belgija, **2023.**; str. 313.
6. Crnčević, D.; Sabljčić, A.; Odžak, R.; Šprung, M. Biological Activity of Novel Environmentally Compatible 3-Amidoquinuclidine Quaternary Ammonium Compounds.
Knjiga sažetaka IX EFMC međunarodnog simpozija o napretku u sintetskoj i medicinskoj kemiji; EFMC: Louvain-la-Neuve, Belgija, **2023.**; str. 140.
7. Sabljčić, A.; Crnčević, D.; Šprung, M.; Odžak, R. The Influence of Amide Group Addition on the Bioactivity of New Soft 3-Amidoquinuclidine QACs.
Knjiga sažetaka 28. hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera; Rogošić, M., ur.; Hrvatsko društvo kemijskih inženjera: Zagreb, Hrvatska, **2023.**; str. 122.
8. Gašo-Sokač, D.; Bušić, V.; Roca, S.; Sabljčić, A. Synthesis of Hydrazone Derivatives of Vitamin B6, Pyridine-4-carbaldehyde and 2-Quinolinecarbaldehyde.
Knjiga sažetaka 28. hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera; Rogošić, M., ur.; Hrvatsko društvo kemijskih inženjera: Zagreb, Hrvatska, **2023.**; str. 26.
9. Sabljčić, A.; Crnčević, D.; Šprung, M.; Odžak, R. Biological Evaluation of 3-Aminoquinuclidine QACs with Long Alkyl Chains as New Potent Antimicrobial Agents.
Knjiga sažetaka IX EFMC međunarodnog simpozija o napretku u sintetskoj i medicinskoj kemiji; EFMC: Louvain-la-Neuve, Belgija, **2023.**; str. 298.
10. Sabljčić, A.; Crnčević, D.; Šprung, M.; Odžak, R. Synthesis and Antibacterial Activity of 3-Aminoquinuclidine Quaternary Ammonium Salts.
Šesti mini simpozij Sekcije za medicinsku i farmaceutsku kemiju; Zagreb, Hrvatska, **2022.**

11. Crnčević, D.; Krce, L.; Cvitković, M.; Sabljčić, A.; Primožič, I.; Odžak, R.; Šprung, M. New Membrane Active Antimicrobial Amphiphiles Derived from Heterocyclic Backbone of Pyridinium-4-aldoxime.
Međunarodni simpozij medicinske kemije; Nice, Francuska, **2022**.
12. Crnčević, D.; Sabljčić, A.; Krce, L.; Primožič, I.; Odžak, R.; Šprung, M. Amidoquinuclidine Salts with Potent Activity Against *Listeria monocytogenes*.
Međunarodni simpozij medicinske kemije; Nice, Francuska, 2022.
13. Crnčević, D.; Sabljčić, A.; Odžak, R.; Šprung, M. Synthesis and Antibacterial Activities of New Amidoquinuclidines and Their Quaternary Salts.
Knjiga sažetaka; Zagreb, Hrvatska, **2021.**; str. 11.