



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**Nuovi derivati della Berberina come inibitori della pompa di
efflusso MexXY-OprM in ceppi clinici di *Pseudomonas aeruginosa*
tobramicina-resistenti**

**New Berberine derivatives as MexXY-OprM efflux pump inhibitors
in tobramycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Elisa Eleonora Beneitez

Relatore:
Prof.ssa Carla Vignaroli

Correlatore:
Prof.ssa Roberta Galeazzi

Sessione autunnale Ottobre 2022
Anno accademico 2021/2022

1.INTRODUZIONE	5
1.1 Antibiotico resistenza.....	5
1.1.2 Antibiotico resistenza acquisita.....	10
1.1.3 Antibiotico resistenza intrinseca.....	13
1.1.4 Pompe di efflusso.....	17
1.2 Pompa di Efflusso MexXY-OprM.....	24
1.3 Inibitori della pompa di efflusso (EPI) MexXY-OprM.....	28
1.3.1 Berberina.....	29
1.3.2 Derivati della Berberina.....	30
1.4 Pseudomonas aeruginosa.....	33
1.5 Biofilm.....	37
1.5.1 Ruolo delle pompe di efflusso.....	46
1.5.2 Effetti degli EPI sulla formazione del biofilm.....	50
2. SCOPO DELLA TESI	54
3. MATERIALI E METODI	55
3.1 Ceppi batterici, terreni, reagenti.....	55
3.1.1 Ceppi batterici.....	55
3.1.2 Terreni di coltura.....	56
3.1.3 Reagenti.....	57
3.2 Determinazione della MIC.....	59
3.3 Test a “scacchiera” (Checkerboard assay)	63
3.4 Produzione di Biofilm.....	66

3.5 Determinazione della MBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentration)	69
3.6 Determinazione della MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration)	72
4.RISULTATI.....	75
4.1 Determinazione della MIC dei ceppi di Pseudomonas aeruginosa.....	75
4.2 Determinazione della MIC dell'associazione tobramicina /Berberina e derivati della Berberina (o-CH ₃ -Ber).....	76
4.3 Test a “scacchiera” Checkerboard.....	78
4.4 Produzione di biofilm.....	84
4.5 MBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentration).....	85
4.6 MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration).....	87
5.DISCUSSIONE.....	93
BIBLIOGRAFIA.....	103

1.INTRODUZIONE

1.1 Antibiotico resistenza

L'emergere di batteri patogeni resistenti a molteplici antibiotici e soprattutto la loro rapida diffusione è attualmente motivo di grande preoccupazione (Potron *et al.*, 2015).

Il progressivo aumento della resistenza agli antibiotici riscontrata nei patogeni umani, rappresenta un importante problema di salute pubblica in tutto il mondo, poiché tale fenomeno limita la scelta di terapie efficaci per il trattamento di infezioni batteriche portando sia all'aumento della mortalità che all'aumento della spesa sanitaria pubblica. Inoltre, con il mancato sviluppo di nuovi antibiotici e la crescente resistenza anche agli antibiotici di ultima generazione, è sempre più necessario cercare di preservare il più a lungo possibile gli antibiotici attualmente disponibili (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Per questi motivi, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha indicato la resistenza agli antibiotici come una delle minacce più importanti per la salute pubblica del 21° secolo (Munita *et al.*, 2016).

Ciò è particolarmente vero per i patogeni nosocomiali responsabili di infezioni opportunistiche in pazienti che hanno subito interventi chirurgici, trapianti, portatori di dispositivi medici o in pazienti immunocompromessi ed ematologici. Molte specie batteriche, circolando in ambienti fortemente selettivi, quali l'ospedale in cui l'uso di antibiotici è elevato, diventano rapidamente multiresistenti e possono essere responsabili di diverse infezioni come: infezioni delle vie urinarie, polmonari, catetere-correlate, batteriemie. La resistenza a più classi di antibiotici è in aumento in tutto il mondo ed è abbastanza comune tra i batteri Gram-negativi non fermentanti, in particolare tra le specie clinicamente rilevanti come *Pseudomonas aeruginosa* (Potron *et al.*, 2015).

La diffusione globale di batteri multiresistenti sta limitando sempre più l'efficacia dei farmaci attualmente disponibili causando significativi fallimenti terapeutici. Di recente, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha indicato una lista di patogeni batterici resistenti agli antibiotici, appartenenti a 12 famiglie o specie diverse, nei confronti dei quali c'è un'assoluta necessità di sviluppare nuove strategie terapeutiche. Questi microrganismi rientrano in tre categorie in base all'urgenza di nuovi antibiotici:

- 1) a priorità critica
- 2) a priorità alta

3) a priorità media

Nella prima categoria, per esempio, sono inclusi i ceppi resistenti ai carbapenemi appartenenti al genere *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e alla famiglia delle Enterobacteriaceae, che sono potenzialmente pericolosi negli ospedali, nelle strutture sanitarie ma anche nella comunità.

La resistenza batterica agli agenti antimicrobici è una delle maggiori minacce per la salute pubblica globale. La selezione della resistenza a un singolo farmaco si traduce spesso nella selezione concomitante di batteri multiresistenti, rendendo le infezioni più difficili da trattare clinicamente, portando a numeri allarmanti di morbilità e mortalità associate a questi tipi di agenti patogeni microbici (Kumar *et al.*, 2020).

Sebbene la scoperta degli antibiotici abbia rivoluzionato il campo della medicina, la produzione e il consumo sempre più su larga scala hanno avuto effetti significativi sulle comunità microbiche (von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Tra il 2000 e il 2010, il consumo di farmaci antibiotici da parte dell'uomo è aumentato del 35% (da 52 057 163 835 unità standard nel 2000 a 70 440 786 553 unità standard nel 2010). Le cefalosporine e le penicilline ad ampio spettro rappresentavano il 55% delle unità standard totali consumate nel 2010 (Figura 1). I maggiori aumenti assoluti del consumo tra il 2000 e il 2010 sono

stati osservati per le cefalosporine (8.1×10^9 unità standard), le penicilline ad ampio spettro (5.8×10^9 unità standard) e i fluorochinoloni (3.0×10^9 standard unità). Gli incrementi relativi più importanti dal 2010 sono stati osservati per i monobattami, i glicopeptidi, cefalosporine e fluorochinoloni. Significativi aumenti dei tassi di consumo sono stati rilevati anche per due classi di antibiotici di ultima istanza: i carbapenemi e le polimixine (Van Boeckel *et al.*, 2014).

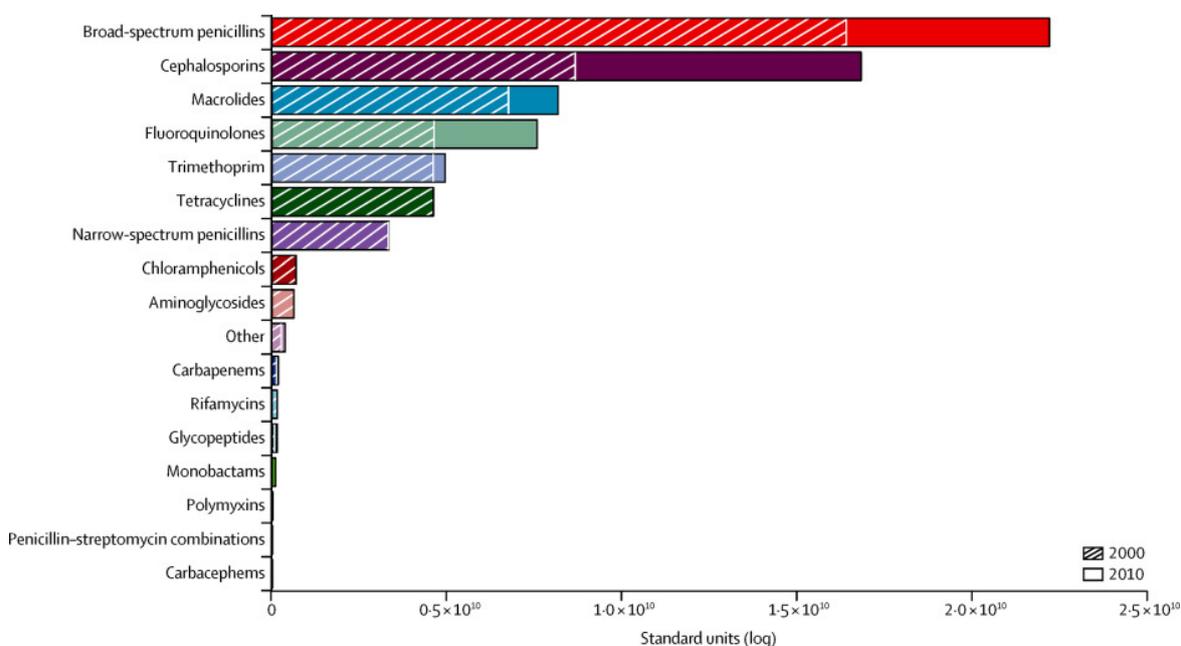


Figura 1. Consumo globale di antibiotici per classe nel 2000 e nel 2010

Le unità standard sono definite come unità di dose singola (cioè pillola, capsula o fiala) (tratto da Van Boeckel et al., 2014).

Gli antimicrobici sono utilizzati anche nella produzione di animali da allevamento sia come agenti terapeutici sia come promotori di crescita. Queste pratiche contribuiscono alla diffusione di agenti patogeni resistenti agli antibiotici sia nel bestiame che nell'uomo, rappresentando una significativa minaccia per la salute pubblica.

Il consumo globale di antimicrobici nella produzione animale alimentare è stato stimato a 63.151 (± 1.560) tonnellate nel 2010 e si prevede che aumenterà del 67%, a 105.596 (± 3.605) tonnellate, entro il 2030 (Van Boeckel *et al.*, 2015).

L'uso e l'abuso di antibiotici in medicina, agricoltura e acquacoltura è stato correlato alla selezione di batteri resistenti. Inoltre il fenomeno è aggravato dal fatto che i residui di antibiotici, batteri resistenti ed elementi genetici di resistenza si diffondono successivamente nell'ambiente (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

La maggior parte degli antibiotici assunti dall'uomo vengono eliminati dall'organismo tal quali e vengono rilasciati nell'ambiente direttamente o attraverso le acque reflue (Sarmah *et al.*, 2006).

Gli scarichi urbani, così come gli impianti di trattamento delle acque reflue, sono considerati dei punti chiave per la diffusione dell'antibiotico-resistenza (AR), poiché i geni di resistenza, gli elementi genetici mobili (MGE) e la

pressione (sub-inibitoria) selettiva esercitata dagli antibiotici provenienti da diverse fonti, contribuiscono allo sviluppo della AR in ceppi commensali e patogeni (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Quindi se gli antibiotici non vengono degradati in modo efficiente e finiscono nell'ambiente, è possibile che questi residui possano aiutare a mantenere o sviluppare popolazioni microbiche resistenti agli antibiotici (Sarmah *et al.*, 2006).

L'aumento dei livelli ambientali di antibiotici, causato dalla crescente domanda sia in campo medico che agricolo, non ha precedenti e ha sconvolto l'equilibrio naturale tra microbi e antimicrobici. Gli effetti sulle comunità microbiche sono di ampia portata e il risultato è la difficoltà sempre maggiore nel prestare un'assistenza sanitaria adeguata, poiché la resistenza a tutti gli antibiotici efficaci si sta diffondendo rapidamente in tutto il mondo (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

1.1.2 Antibiotico resistenza acquisita

I batteri utilizzano due principali strategie per difendersi dall'azione dell'antibiotico: *i*) mutazioni del genoma che spesso riguardano geni che

codificano le molecole bersaglio dell'antibiotico e **ii**) acquisizione, attraverso meccanismi di trasferimento genico orizzontale (HGT), di DNA esogeno contenente i determinanti della resistenza (Munita J. M. *et al.*, 2016).

I tre principali meccanismi mediante i quali i batteri trasferiscono materiale genetico orizzontalmente sono: la coniugazione, la trasformazione e la trasduzione.

Gli eventi che caratterizzano la coniugazione sono: a) contatto cellula donatore-cellula ricevente, b) formazione del ponte coniugativo ed infine c) trasferimento di DNA plasmidico attraverso un *pilus* coniugativo. Il *pilus* coniugativo è considerato un macchinario del sistema di secrezione di tipo IV. I geni per l'apparato di coniugazione sono associati a plasmidi in grado di replicare autonomamente o ad elementi coniugativi integrati nel cromosoma.

La trasformazione è un processo che può verificarsi naturalmente in diverse specie batteriche che sono in grado di assumere del DNA libero dall'ambiente e incorporarlo nei loro genomi. Solo le cellule batteriche che si trovano in uno stato fisiologico detto "competenza", che può essere anche transitorio, sono in grado di acquisire DNA mediante trasformazione (Huddleston *et al.*, 2014).

Il processo complessivo di trasformazione consiste: nel rilascio di DNA dalle cellule donatrici, più spesso in seguito a lisi, nella diffusione e persistenza del

DNA ed infine nell'adsorbimento e incorporazione nel genoma (per ricombinazione omologa) del DNA esogeno da parte delle cellule competenti.

La trasduzione è un altro meccanismo di trasferimento genico orizzontale che ha contribuito all'evoluzione dei genomi batterici. L'abbondanza di informazioni sul trasferimento dei geni di resistenza agli antibiotici tramite i batteriofagi è limitata rispetto a quelle che si hanno sull'acquisizione dell'antibiotico resistenza in seguito alla trasformazione naturale e alla coniugazione. Tuttavia, il ruolo dei batteriofagi nella trasduzione dei geni di resistenza agli antibiotici sta diventando più chiaro. I batteriofagi sono virus che infettano i batteri e sono distinti in fagi litici e fagi temperati. Questi ultimi, prima di andare incontro ad un ciclo litico di replicazione possono integrare il proprio genoma in quello dell'ospite. In questa forma i fagi vengono chiamati profagi e possono rimanere in questo stato per lungo tempo fino a quando le condizioni ambientali non innescano la loro crescita litica. Il profago in alcuni casi può conferire alla cellula ospite nuove caratteristiche oltre che la resistenza all'infezione da batteriofagi dello stesso gruppo (Huddleston *et al.*, 2014).

La trasduzione si verifica quando un batteriofago che si è precedentemente replicato in un'altra cellula batterica incorpora una porzione del genoma ospite

(donatore) nella testa del fago e trasferisce i geni a un'altra cellula batterica (ricevente) (Huddleston *et al.*, 2014).

1.1.3 Antibiotico resistenza intrinseca

I batteri oltre ad avere la capacità di "acquisire" resistenza agli antibiotici, possono anche essere intrinsecamente resistenti a diverse classi di antibiotici a causa delle caratteristiche di ogni singola specie batterica e, indipendentemente dalla pressione selettiva dell'antibiotico. In effetti, l'esempio più tipico di resistenza intrinseca agli antibiotici è il fenotipo multiresistente (MDR) mostrato dai batteri Gram-negativi, che sono insensibili a molte classi di antibiotici efficaci contro i Gram-positivi. La base molecolare di questo fenomeno è la presenza nei Gram-negativi della membrana esterna (ME), impermeabile a molte molecole, e dell'espressione di numerose pompe di efflusso MDR che riducono efficacemente la concentrazione intracellulare del farmaco somministrato (Cox *et al.*, 2013).

La frequenza delle infezioni causate da patogeni Gram-negativi sta aumentando ad un ritmo allarmante; queste infezioni rappresentano una seria minaccia clinica poiché sono spesso difficili da trattare. La resistenza intrinseca dei

batteri Gram-negativi limita drasticamente le opzioni terapeutiche per il trattamento delle infezioni causate da patogeni Gram-negativi.

A causa della relativa impermeabilità della ME, è essenziale che i batteri possiedano meccanismi aggiuntivi che consentono l'assimilazione dei nutrienti essenziali dal mezzo esterno. Infatti, la ME è costellata da una varietà di proteine appartenenti alla classe delle porine, che possono essere di due tipi. Quelle costituite da canali proteici acquosi che fungono da porine di diffusione generale in grado di controllare il passaggio di molecole in base alle loro dimensioni. Ci sono poi porine più specifiche che contengono siti di legame all'interno dei pori che consentono il riconoscimento e il passaggio di specifici soluti che sono necessari per la crescita batterica (Cox *et al.*, 2013).

Sebbene questi canali consentano l'ingresso di nutrienti chiave, limitano anche l'afflusso di numerosi antibiotici, contribuendo alla resistenza intrinseca agli antibiotici di molti organismi. Le porine ostacolano l'ingresso di farmaci mediante una serie di meccanismi tra cui limitazioni dimensionali, idrofobicità e repulsione della carica.

La resistenza intrinseca conferita dalla ME è particolarmente evidente nel patogeno opportunisto *Pseudomonas aeruginosa*. Nonostante la bassa permeabilità della ME di *P.aeruginosa*, è stato dimostrato che possiede un

ampio limite di esclusione rispetto alla specie *E. coli* consentendo il passaggio di molecole fino a ~ 3000 Da, e impedendo efficacemente l'ingresso della maggior parte degli agenti antibatterici. Questa riduzione della permeabilità è vantaggiosa per l'azione della β -lattamasi costitutive prodotte da *P. aeruginosa*, localizzate nel periplasma. L'enzima inattiva i β -lattamici ad una velocità ottimale quando le molecole passano nel periplasma; in effetti, questo meccanismo gioca un ruolo chiave nella resistenza intrinseca di *P. aeruginosa* agli antibiotici β -lattamici (Cox *et al.*, 2013).

La ME dei batteri serve a rallentare il passaggio di piccole molecole ma non può bloccarne completamente l'ingresso e quindi non è responsabile da sola dell'alto livello di resistenza che si osserva nei confronti di alcuni farmaci. Tuttavia, la presenza in *P. aeruginosa* di un ulteriore meccanismo, come la produzione di β -lattamasi periplasmica o l'efflusso attivo, può avere effetti sinergici pronunciati sui livelli di resistenza intrinseca rivelando un'interazione tra la ME e meccanismi di resistenza aggiuntivi (Cox *et al.*, 2013).

Diversi meccanismi biochimici comuni utilizzati dai batteri consentono loro di tollerare dosi di antibiotici altrimenti letali, e sono questi meccanismi che alla fine conferiscono un fenotipo resistente. Uno di questi meccanismi comuni è l'alterazione del bersaglio previsto di un farmaco, che si verifica più spesso

quando i batteri mutano una proteina bersaglio facendola diventare meno suscettibile all'agente antimicrobico. L'espressione di un bersaglio farmacologico mutato può diffondersi tramite elementi genetici trasferibili, come, ad esempio, plasmidi o trasposoni, a specie batteriche completamente distinte.

Un altro noto meccanismo di resistenza riguarda l'inattivazione dell'agente antimicrobico, che può avvenire tramite modificazioni chimiche del farmaco (come nel caso degli aminoglicosidi) o tramite processi litici che provocano la degradazione del farmaco (come nel caso di β -lattamici). Entrambi i meccanismi di inattivazione sono stati trovati codificati da plasmidi presenti in di ceppi antibiotico-resistenti (Cox *et al.*, 2013).

1.1.4 Pompe di efflusso

Uno dei meccanismi di resistenza batterica agli antimicrobici meglio studiati è quello che si basa sulla produzione di proteine di membrana che prendono il nome di pompe di efflusso, spesso farmaco-specifiche. L'efflusso attivo dell'antibiotico all'esterno della cellula batterica riduce la sua concentrazione intracellulare, favorendo così la sopravvivenza del batterio e l'eventuale sviluppo di mutazioni che aumentano la resistenza a quell'antibiotico. Le pompe di efflusso possono essere trovate nella stragrande maggioranza delle specie batteriche conosciute e sono in grado di espellere una varietà di farmaci strutturalmente diversi sfruttando un gradiente ionico attraverso la membrana o l'idrolisi dell'ATP che fornisce l'energia necessaria per il trasporto della sostanza antimicrobica (Kumar *et al.*, 2020).

Le pompe di efflusso sono formate da proteine di trasporto coinvolte nell'estruzione di substrati tossici (comprese praticamente tutte le classi di antibiotici clinicamente rilevanti) dall'interno delle cellule nell'ambiente esterno. Queste proteine si trovano sia nei batteri Gram-positivi che Gram-negativi, nonché negli organismi eucarioti. Le pompe possono essere specifiche per un substrato o trasportare una gamma di composti strutturalmente diversi (compresi antibiotici di classi multiple); tali pompe possono essere associate a resistenza multipla ai farmaci (MDR).

Nel regno procariotico ci sono cinque grandi famiglie di trasportatori di efflusso. È probabile che queste pompe siano evolute affinché le sostanze nocive potessero essere trasportate fuori dal batterio, consentendo la sua sopravvivenza. Sono stati descritti sistemi di efflusso che contribuiscono alla resistenza agli antibiotici in numerosi batteri clinicamente importanti, tra cui *Campylobacter jejuni* (CmeABC), *E. coli* (AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, EmrB, EmrD), *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB -OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM), *Streptococcus pneumoniae* (PmrA), *Salmonella typhimurium* (AcrB) e *Staphylococcus aureus* (NorA) (Webber *et al.*, 2003).

Il fenomeno dell'efflusso multifarmaco nei batteri è stato segnalato per la prima volta da Ball *et al.* e McMurry *et al.* per l'efflusso di tetracicline in *Escherichia coli*. Questo tipo di resistenza era trasferibile tra ceppi ed era codificata da determinanti *tet* (tetraciclina), presenti su plasmidi o trasposoni. Da questa scoperta iniziale, sono stati identificati ulteriori sistemi di efflusso nei batteri Gram-positivi e Gram-negativi e, più recentemente, nei micobatteri.

I trasportatori di efflusso batterico possono essere suddivisi in cinque famiglie principali basate sull'omologia di sequenza amminoacidica. Le superfamiglie sono suddivise in:

- major facilitator superfamily (MF)

- Resistance-nodulation division (RND)
- Small multidrug Resistance (SMR)
- ATP-binding cassette (ABC)
- multidrug and toxin extrusion (MATE) (Figura 2).

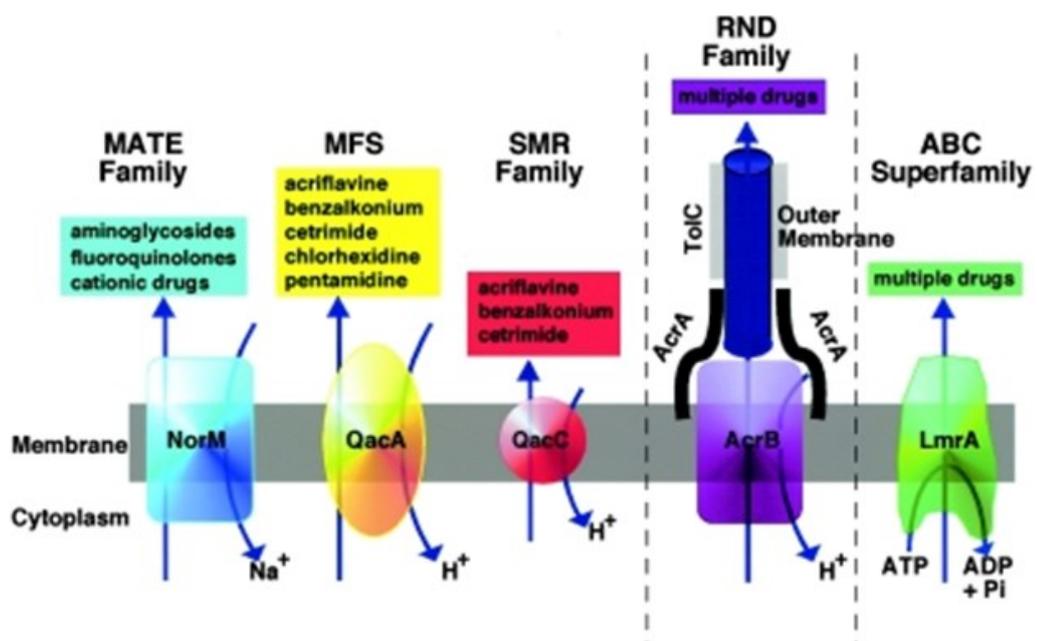


Figura 2. Rappresentazione famiglie pompe di efflusso

(Tratto da Piddock et al., 2006).

Le prime tre famiglie ottengono l'energia necessaria per estrarre un farmaco dalla cellula grazie alla forza proton-motrice in un sistema antiporto protone-farmaco, mentre la famiglia MATE è guidata dallo scambio di protoni o ioni

sodio. Al contrario, la famiglia ABC accoppia l'estrusione di farmaci con l'idrolisi dell'ATP.

L'efflusso di farmaci dai batteri Gram-positivi è mediato da un singolo trasportatore localizzato sulla membrana citoplasmatica delle famiglie MF, SMR o ABC. Le pompe di efflusso nei batteri Gram-negativi sono più complesse per la presenza di una membrana esterna; formano un canale proteico tripartito, che richiede una proteina che attraversa il periplasma nota come proteina di fusione della membrana (MFP) e una proteina di efflusso della membrana esterna (OEP) insieme al trasportatore situato nella membrana citoplasmatica. Non è raro che un organismo codifichi più di una pompa di efflusso, che può essere espressa costitutivamente o indotta in risposta diretta alla presenza di un substrato (Stavri *et al.*, 2006).

La specie *P. aeruginosa* è spesso considerata resistente a molti antibiotici e storicamente ciò è stato attribuito alla bassa "permeabilità" della membrana esterna. Tuttavia, sono stati forniti dati per indicare che la resistenza alla tetraciclina, al cloramfenicolo e ad alcuni fluorochinoloni era mediata dall'efflusso. Poole *et al.* hanno descritto un operone di efflusso, MexAB-OprM, in un ceppo *wild type* di *P. aeruginosa*; la delezione di componenti di questo sistema conferiva l'ipersensibilità a una varietà di agenti antimicrobici (Pidcock *et al.*, 2006).

Le pompe di efflusso multifarmaco contribuiscono quindi alla resistenza intrinseca di *P. aeruginosa* (Stavri *et al.*, 2006).

Oltre al sistema MexAB-OprM, sono state caratterizzate anche altre tre pompe di efflusso RND: MexXY-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN (Pidcock *et al.*, 2006).

Come il sistema MexAB-OprM, anche MexXY-OprM conferisce resistenza intrinseca a molti antibiotici (Pidcock *et al.*, 2006).

Le infezioni da *P. aeruginosa* vengono solitamente trattate con ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem, gentamicina, tobramicina, ticarcillina-clavulanato o piperacillina-tazobactam in combinazione o da soli. Alcuni di questi agenti sono substrati delle pompe di efflusso Mex (Pidcock *et al.*, 2006).

Negli ultimi decenni, con lo sviluppo di vari approcci molecolari, come la PCR quantitativa (RT-qPCR) e l'immunoblotting, è stata confermata l'associazione della iper-espressione delle pompe di efflusso con livelli di antibiotico resistenza clinicamente rilevanti.

In *P. aeruginosa* MexAB-OprM, omologo del sistema AcrAB-TolC di *E. coli*, e MexXY-OprM, sono due sistemi di efflusso RND, entrambi espressi costitutivamente che possono esportare attivamente fluorochinoloni,

tetraciclina e cloramfenicolo. Oltre a questi substrati comuni, il sistema MexAB-OprM può anche esportare novobiocina e β -lattamici (come la carbenicillina), mentre il sistema MexXY può esportare anche aminoglicosidi (Sun *et al.*, 2014).

Il sistema tripartito MexAB-OprM è stato il primo ad essere identificato ed è stato il meglio caratterizzato nel batterio. L'esportatore multifarmaco MexB appartiene alla famiglia RND e la sua espressione costitutiva conferisce resistenza intrinseca a un ampio spettro di agenti antimicrobici in *P. aeruginosa*. MexB è strettamente correlato a AcrB di *E. coli*. Sono state riportate anche le strutture cristalline dei singoli componenti proteici della pompa di efflusso: MexA, MexB e OprM. Il confronto delle strutture di MexB e di AcrB ha mostrato che la somiglianza strutturale tra le due proteine è notevole (l'omologia è circa del 70% a livello della sequenza aminoacidica) (Sun *et al.*, 2014). (Figura 3).

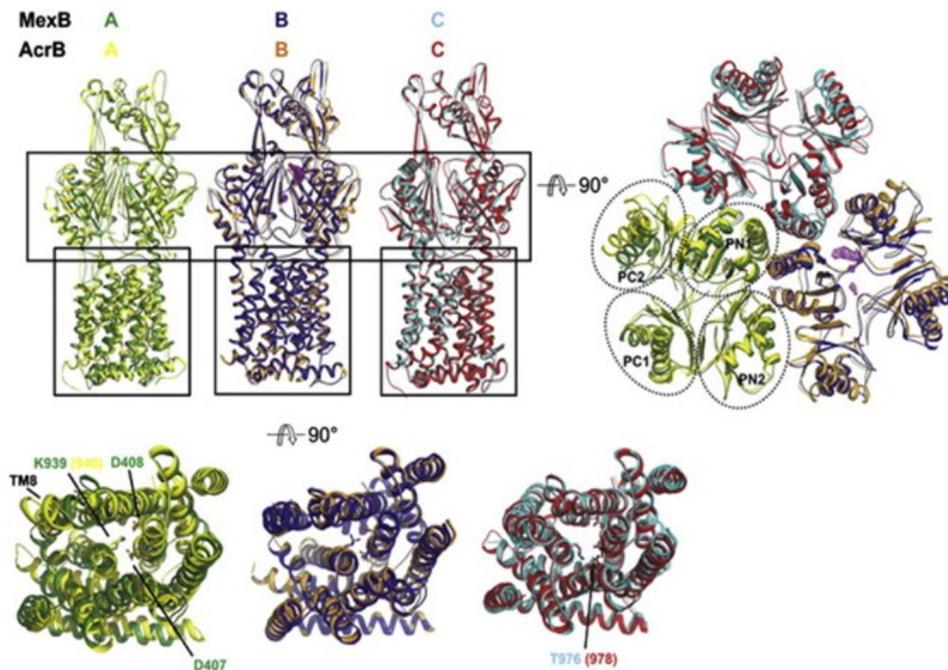


Figura 3. Confronto delle strutture di MexB e *E. coli* AcrB

(tratto da Sun *et al.*, 2014).

Il riconoscimento in tutti i genomi batterici di geni che codificano pompe di efflusso la cui espressione è soggetta a un rigido controllo da parte di vari regolatori trascrizionali locali e globali ha portato all'ipotesi che le pompe di efflusso dei farmaci possano avere funzioni fisiologiche, specialmente durante l'adattamento a condizioni di stress, nei meccanismi di patogenicità e virulenza dei batteri. Ci sono ormai prove evidenti che dimostrano che le pompe di efflusso dei farmaci svolgono effettivamente un ruolo generale di disintossicazione in vari processi fisiologici batterici (Sun *et al.*, 2014).

1.2 Pompa di Efflusso MexXY-OprM

Mentre in tante specie batteriche lo sviluppo della resistenza agli aminoglicosidi è prevalentemente mediato da enzimi che modificano tali antibiotici, in *P. aeruginosa* la resistenza agli aminoglicosidi è dovuta oltre che all'inattivazione enzimatica di questi antibiotici anche all'espressione di sistemi di efflusso multifarmaco (Sobel *et al.*, 2003).

La pompa di efflusso multifarmaco denominata MexXY di *P. aeruginosa* oltre alla capacità di esportare un'ampia gamma di antibiotici (p. es., tetracicline, macrolidi, chinoloni, cloramfenicolo e β -lattamici) ha la proprietà distintiva di poter esportare gli aminoglicosidi (Hocquet *et al.*, 2003).

Per verificare il contributo della pompa di efflusso MexXY nella resistenza agli aminoglicosidi, i geni di MexXY sono stati deleti in diversi isolati clinici ed è stato valutato l'impatto sulla resistenza a tali antibiotici. Inizialmente si è andata a valutare l'espressione di *mexXY* mediante RT-PCR per correlarla con i livelli di resistenza degli isolati clinici. In seguito a delezione dei geni *mexXY* negli isolati le MIC nei confronti degli aminoglicosidi diminuivano, indicando che MexXY contribuisce, di fatto, alla resistenza. È interessante notare che la maggiore riduzione dei valori di MIC dopo la delezione di *mexXY* si riscontrava nel ceppo con i livelli più alti di espressione di *mexXY* indicando che MexXY

è uno dei principali determinanti della resistenza agli aminoglicosidi in questo isolato (Sobel *et al.*, 2003).

MexXY-OprM forma un sistema di efflusso costituito da: i) un canale antiporto (farmaco/H⁺) situato nella membrana interna (MexY), ii) una proteina-canale nella membrana esterna (OprM) e iii) una proteina periplasmatica di fusione che unisce le due componenti (MexX) (Hocquet *et al.*, 2003).

Il sistema MexXY-OprM estrude composti idrofili, inclusi aminoglicosidi come la tobramicina ed appartiene alla famiglia RND. Da un punto di vista strutturale, MexXY-OprM è un sistema tripartito caratterizzato da un meccanismo di estrusione del farmaco a spese di un gradiente di protoni come in tutti i sistemi di efflusso RND. MexY è la proteina della membrana interna, organizzata come un omotrimerico che presenta un dominio transmembrana (TM), formato da 12 catene ad alfa-elica e un dominio periplasmatico, che è direttamente coinvolto nell'accesso, nel legame e nell'estrusione dei substrati. Il dominio periplasmatico include inoltre un dominio porter (PD) e un dominio TolC. Il PD è caratterizzato da altri quattro sottodomini chiamati PC1, PC2, PN1 e PN2, mentre il dominio TolC è suddiviso in due sottodomini denominati DC e DN. Il percorso di estrusione del substrato è caratterizzato da una rotazione funzionale e da un cambiamento conformazionale ciclico in ciascun protomero dell'omotrimero in tre diversi stati: libero (per la fase di accesso),

stretto (per la fase di legame) e aperto (per la fase di fase di estrusione). Il PD di ciascun protomero racchiude due tasche di legame del substrato, quella di accesso (AP) e quella di legame (DP). Entrambi sono coinvolti nella traslocazione dei ligandi attraverso un movimento peristaltico. Questi due siti di legame sono separati da un anello G, che regola il passaggio tra queste due tasche. Si possono descrivere tre differenti vie per l'accesso dei substrati al trasportatore MexY: (i) l'ingresso sopra le eliche TM7/TM8 dal lembo esterno della membrana interna e tasca per rilegatura (CH1); (ii) periplasmatico, attraverso la fessura attraverso composti idrofili tra i sottodomini PC1 e PC2 (CH2); e (iii) attraverso lo spazio tra i protomeri nella cavità centrale (CH3) (Figura 4) (Giorgini *et al.*, 2021).

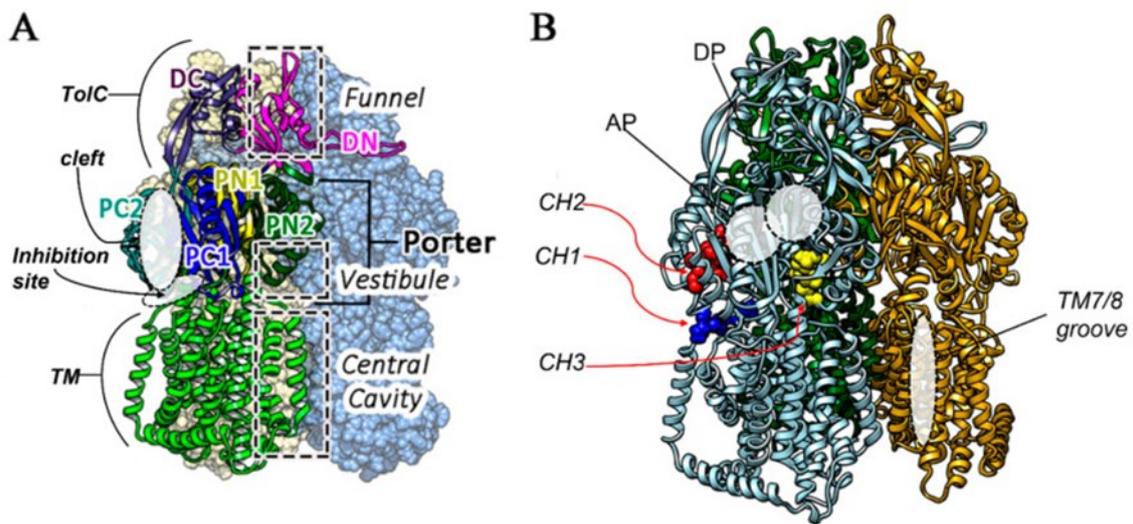


Figura 4. Domini di MexY

(tratto da Giorgini *et al.*, 2021)

Il canale interno MexY di diversi ceppi di *P. aeruginosa* è caratterizzato da estesi polimorfismi di sequenza, che possono influenzare le modalità di legame dei substrati e degli inibitori della pompa di efflusso (EPI). Questi polimorfismi possono spiegare le differenze nella capacità di MexY di legare gli EPI e lo studio dell'affinità di legame in diversi ceppi batterici può aiutare a identificare nuove molecole da utilizzare come EPI efficienti (Giorgini *et al.*, 2021).

1.3 Inibitori della pompa di efflusso (EPI) MexXY-OprM

Gli antibiotici sono impiegati ormai da decenni come "farmaci miracolosi" per uccidere i microbi, ma alla fine del XX secolo, la ricerca di nuove molecole si è quasi interrotta. Pertanto, sono necessarie nuove strategie per aggirare la resistenza antimicrobica batterica (Kumar *et al.*, 2020).

Possiamo considerare le pompe di efflusso come bersagli antibatterici potenzialmente efficaci. L'inibizione delle pompe di efflusso da parte di un inibitore della pompa di efflusso (EPI) ripristinerebbe l'attività di un agente soggetto ad efflusso (Li *et al.*, 2004).

Gli EPI sono molecole di varia natura (naturali, semi-sintetici e sintetici), prive di attività antimicrobica e in grado di agire in modo sinergico con gli antibiotici substrati della pompa. Sono capaci di inibire l'efflusso degli antibiotici dalla cellula microbica e di permettere l'accumulo dei farmaci in ambiente intracellulare. In questo modo la sensibilità dei ceppi resistenti viene ripristinata (Cannalire *et al.*, 2020).

Una questione importante quando si identifica un potenziale EPI è garantire che l'attività evidenziata sia dovuta all'interferenza della molecola con la pompa d'efflusso piuttosto che a qualsiasi altra attività antibatterica dell'EPI (Piddock *et al.*, 2006).

1.3.1 Berberina

La Berberina (Be) (Figura 5) è un alcaloide naturale estratto da diverse piante tra cui *Hydratis canadensis* e *Berberis aristata*. Studi in silico hanno dimostrato che potrebbe essere utilizzata come EPI perché presenta attività specifica contro la pompa MexXY-OprM di *P. aeruginosa* ed ha mostrato attività antimicrobica sinergica in associazione con la tobramicina nei confronti di ceppi aminoglicosidi-resistenti (Laudadio *et al.*, 2019).

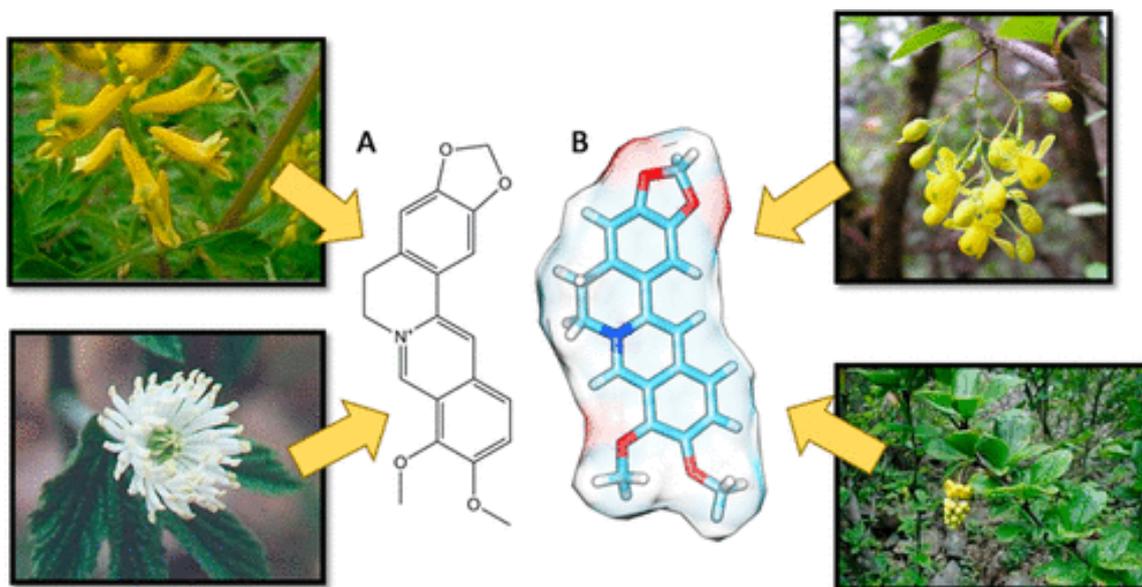


Figura 5. *Struttura in 2D (A) e 3D (B) della Berberina*
(tratto da Laudadio *et al.*, 2019).

Prove in silico hanno dimostrato che l'EPI Berberina entra in competizione con l'antibiotico tobramicina per il sito di legame nella pompa di efflusso MexXY-OprM di *P. aeruginosa*. La berberina forma un complesso più stabile con la proteina MexY e questo impedisce il legame della tobramicina che quindi non può essere espulsa dalla cellula. Questo permette all'antibiotico di agire a livello del suo bersaglio intracellulare, aggirando il meccanismo di resistenza del ceppo (Laudadio *et al.*, 2019).

1.3.2 Derivati della Berberina

Sono stati studiati dei derivati della Berberina (Ber) per aumentare l'attività inibitoria. La MexY è presente in diverse varianti polimorfiche, quindi nello studiare l'attività della berberina e dei suoi derivati, è stata valutata l'affinità con le varie forme mutate di MexY per valutare se l'attività e il *binding* fossero influenzati dalle variazioni degli aminoacidi presenti. Per farlo sono stati creati dei polimorfismi della proteina MexY per andare a vedere come si legavano i derivati della berberina. Il derivato che in vitro ha avuto risultati migliori è il

13-(2-metilbenzil)-berberina (o-CH₃-Ber) (Figura 6) (Giorgini et al, 2021). L'o-CH₃-berberina presenta un gruppo benzilico sul carbonio C13 della berberina e un gruppo metile in posizione orto sull'anello benzilico.

L' o-CH₃-Ber, come la berberina, si lega con alta affinità nel sito di inibizione laterale a livello del canale di accesso del substrato CH1 della proteina MexY impedendo il reclutamento dell'antibiotico. I dati in vitro mostrano un'attività EPI maggiore di quella della berberina per questo derivato, che ha esercitato una riduzione della MIC della tobramicina fino a 4 volte maggiore rispetto alla berberina e richiede anche una minore concentrazione per avere un effetto sinergico con l'antibiotico (Giorgini *et al.*, 2021).

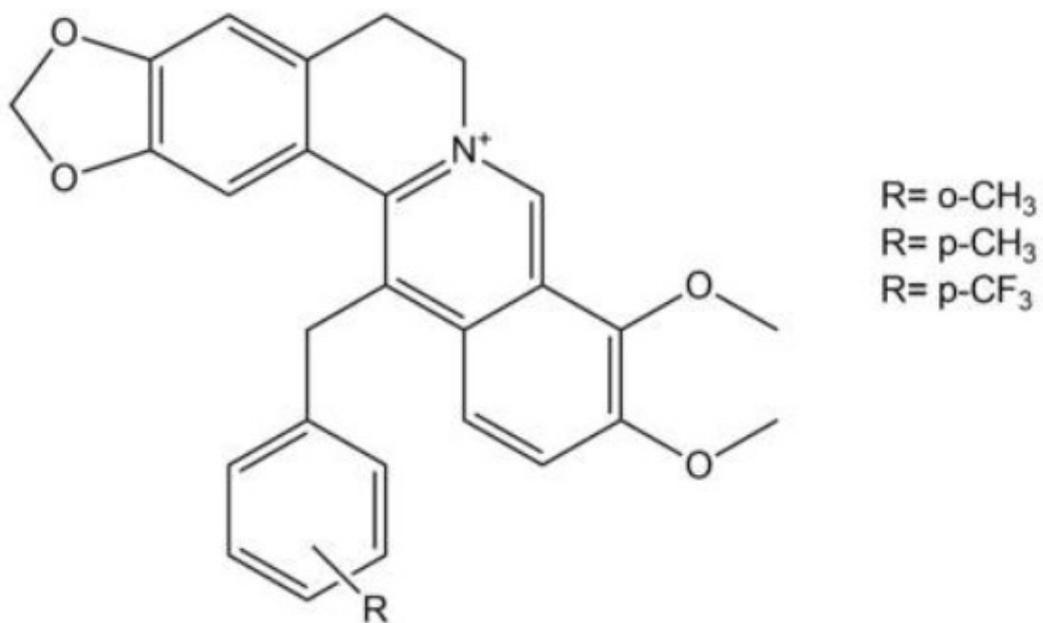


Figura 6. *Derivati della Berberina o-CH₃-Ber*
(tratto da Giorgini et al., 2021)

1.4 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa è una specie batterica appartenente alla famiglia delle Pseudomonadaceae. È un bacillo Gram negativo non fermentante con una scarsa esigenza nutritiva, il che gli conferisce un'ampia diffusione. È un patogeno opportunisto di rilevante importanza in ambito nosocomiale che pone un problema medico significativo per la società. Raramente colpisce individui sani, ma provoca morbilità e mortalità elevate nei pazienti con fibrosi cistica (FC) e negli individui immunocompromessi (Pang *et al.*, 2019).

P. aeruginosa è una delle principali cause (18%-20%) di infezioni polmonari nosocomiali (chiamate anche polmonite nosocomiale o associata all'assistenza sanitaria). Ciò è dovuto all'elevata prevalenza di pazienti immunocompromessi, alla capacità di *P. aeruginosa* di sviluppare biofilm sulle superfici dei dispositivi medici, all'aumento della circolazione di ceppi multiresistenti nei reparti ospedalieri e tra il personale sanitario che può risultare portatore di questo batterio (Pang *et al.*, 2019).

P. aeruginosa può anche stabilire infezioni polmonari persistenti, come nei pazienti con fibrosi cistica (FC) (Rada *et al.*, 2017).

Le caratteristiche principali sono:

- aerobio\ anaerobio facoltativo
- ossidasi positivo
- non fermentante
- catalasi positivo
- produzione di pigmenti

Cresce su tutti i comuni terreni a temperature che vanno da 4 a 42° C.

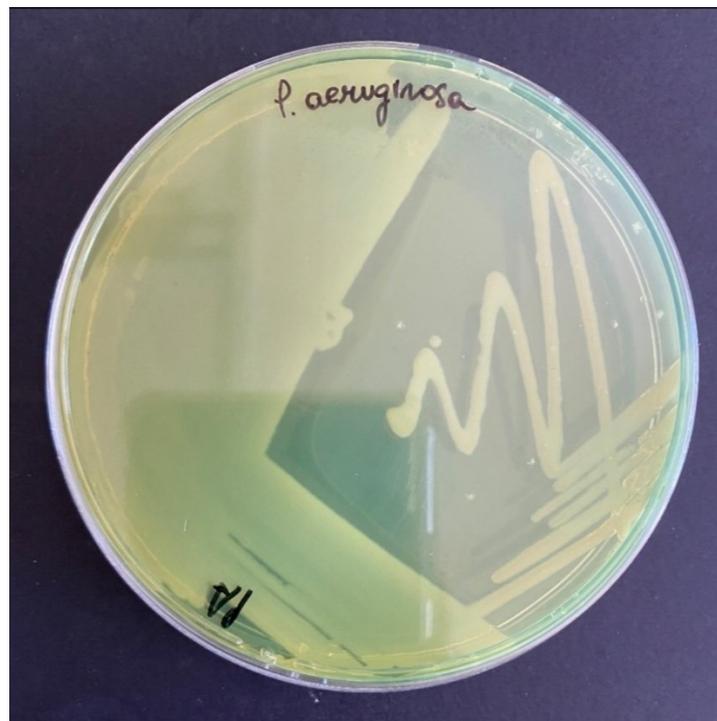


Figura 7. Ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* K767 su piastra di *Pseudomonas* agar

P. aeruginosa presenta diversi fattori di virulenza:

- componenti strutturali: adesine fimbriali\afimbriali, capsula, lipopolisaccaride, lipide A
- enzimi e altri prodotti: neuraminidasi (che rimuove l'acido sialico sulla superficie cellulare e scopre alcuni recettori che sono utili per l'adesione di questo microorganismo), elastasi (distrugge tessuti che hanno elastina e collagene), proteasi alcalina (degrada fibrina e collagene), pigmenti come la piocianina che induce la formazione del superossido e perossido di idrogeno che distruggono gli epitelii ciliati.
- Tossine: esotossina A che blocca la sintesi proteica e l'esotossina S che ha attività ADP-ribosilante, 2 emolisine (fosfolipasi C e glicolipide), endotossina (Gellatly *et al.*, 2013).

Come detto in precedenza, *Pseudomonas aeruginosa* è spesso resistente a più antibiotici e di conseguenza viene annoverato tra i “*superbugs*”, cioè tra i batteri contro i quali rimangono pochissimi antibiotici efficaci (Breidenstein *et al.*, 2011).

Perciò è un microorganismo difficile da trattare con antibiotici ed ha una rilevante importanza in infezioni ospedaliere soprattutto in pazienti affetti da

fibrosi cistica (CF). In generale, la resistenza si può attribuire a una combinazione di diversi fattori:

- Resistenza intrinseca dovuta alla struttura della parete batterica e alla possibilità di formare biofilm
- Mutazioni cromosomali che possono indurre resistenza
- Resistenza acquisita (Lambert P A, 2002).

1.5 Biofilm

Le pompe di efflusso sono ampiamente implicate nella resistenza agli antibiotici perché possono estrudere la maggior parte degli antibiotici clinicamente rilevanti dall'interno delle cellule all'ambiente extracellulare. Tuttavia, vi sono prove crescenti, in seguito a numerosi studi, che suggeriscono che le pompe svolgono anche un ruolo nella formazione del biofilm. In particolare, sono state studiate diverse specie patogene chiave associate all'aumento della resistenza multifarmaco, come *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Gli studi hanno dimostrato che le pompe di efflusso, tra cui AcrAB-TolC di *E. coli*, MexAB-OprM di *P. aeruginosa*, AdeFGH di *A. baumannii* e AcrD di *S. enterica*, svolgono ruoli importanti nella formazione del biofilm (Alav *et al.*, 2018).

Sebbene lo sviluppo della resistenza agli antibiotici nei batteri sia un evento naturale, le influenze antropiche, come l'uso eccessivo di antibiotici, la prescrizione inappropriata e l'uso estensivo in agricoltura, hanno tutti contribuito all'emergere e alla diffusione dei batteri MDR, che sono resistenti a molti degli antibiotici clinicamente rilevanti. Recentemente, l'OMS ha pubblicato il primo elenco in assoluto di 12 agenti patogeni MDR che attualmente rappresentano la più grande minaccia per la salute umana e

richiedono lo sviluppo urgente di nuovi antibiotici per il loro trattamento. Molti degli organismi in cui la funzione delle pompe di efflusso è collegata ad alterazioni nella formazione di biofilm sono inclusi in questo elenco.

Il problema della resistenza agli antibiotici è ulteriormente aggravato dalla crescita dei batteri in forma di biofilm, che mostrano una tolleranza/resistenza genotipica e fenotipica agli antibiotici significativamente più elevata rispetto alle stesse cellule in forma planctonica (Alav *et al.*, 2018).

I biofilm sono comunità di batteri altamente organizzate e strutturate adese ad una superficie abiotica o biotica. Queste comunità sono racchiuse in sostanze polimeriche extracellulari (EPS) che possono essere costituite da polisaccaridi, acidi nucleici, lipidi e proteine. La matrice EPS costituisce la maggior parte (50–90%) del volume del biofilm e conferisce robustezza sia fisica che chimica alla comunità resistendo alle forze meccaniche (es. acqua che scorre) e diminuendo la penetrazione di sostanze chimiche tossiche (es. antibiotici, molecole di difesa dell'ospite) e di eventuali predatori (Gellatly *et al.*, 2013).

La formazione del biofilm si sviluppa in 4 fasi principali: (1) l'attacco, che vede le cellule prendere contatto e aderire alla superficie; (2) la crescita, durante la quale le cellule si dividono e si ha la formazione della microcolonia che raggiunta una dimensione limite inizia a produrre l'esopolisaccaride che

costituisce la matrice (3) la maturazione, in cui si passa alla formazione di cluster cellulari multistrato; (4) il distacco, fase durante la quale il biofilm raggiunge la completa maturazione ed alcune cellule possono tornare nello stato planctonico in grado di colonizzare altri substrati su cui formare biofilm (Figura 8).

È stato proposto che i meccanismi di distacco possono essere suddivisi in due categorie: attivi e passivi. Il distacco attivo si riferisce a meccanismi avviati dai batteri stessi, come la degradazione enzimatica della matrice del biofilm, il rilevamento del quorum, ecc. D'altra parte, il distacco passivo si riferisce a quello mediato da forze esterne come l'abrasione e l'intervento umano. È stato anche proposto che il processo di distacco possa essere causato dall'attività dei batteriofagi all'interno del biofilm (Sara M. Soto, 2013).

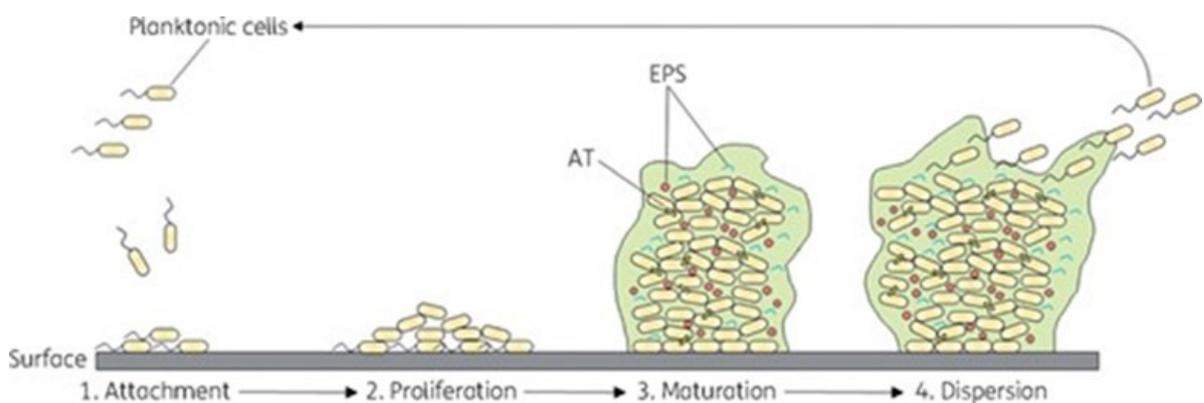


Figura 8. *Formazione del biofilm (Tratto da Alav et al., 2018).*

L'adozione e il mantenimento di una modalità di crescita del biofilm da parte dei batteri è regolata dal quorum sensing (QS), che è un sistema di comunicazione intercellulare che coinvolge molecole segnale per coordinare vari comportamenti e processi batterici in base alla densità della popolazione cellulare. Per comprendere il possibile ruolo delle pompe di efflusso nella formazione di biofilm e metterlo in relazione con la resistenza agli antibiotici mediata dai biofilm, è necessario fornire una panoramica dei meccanismi del QS nei batteri Gram-negativi e Gram-positivi (Alav *et al.*, 2018).

Il quorum sensing (QS) è un processo mediante il quale i batteri sintetizzano molecole note come autoinduttori (AI) che rilasciano nell'ambiente extracellulare per mediare la comunicazione intercellulare e alle quali rispondono. I batteri utilizzano infatti la concentrazione di AI nel loro ambiente per monitorare le variazioni di densità cellulare della propria popolazione e per coordinare l'espressione dei geni specifici del quorum. Questi geni sono coinvolti in vari comportamenti batterici, tra cui la produzione di antibiotici, la formazione di biofilm, la bioluminescenza, la competenza genetica, la sporulazione e la virulenza.

Esistono differenze nel tipo di AI utilizzati, nei meccanismi di trasmissione del segnale e nell'identità dei geni specifici del quorum tra diverse specie di batteri; tuttavia, tutti i sistemi QS dipendono da tre step essenziali: sintesi di AI, rilevamento di AI da parte dei recettori e attivazione di geni specifici del quorum da parte di fattori di trascrizione. Durante i periodi di bassa densità di popolazione, gli AI diffondono nell'ambiente e la loro concentrazione rimane al di sotto della soglia richiesta per il rilevamento. Un aumento della densità di popolazione fa sì che ci siano molte cellule nelle immediate vicinanze che sintetizzano AI, il che si traduce in un accumulo di AI, raggiungendo concentrazioni sufficientemente elevate da consentirne il rilevamento da parte dei recettori, che possono essere intracellulari o legati alla membrana. Il legame delle AI al rispettivo recettore innesca l'inizio della trascrizione dei geni specifici del quorum, nonché dei geni coinvolti nella sintesi delle AI.

I batteri Gram-negativi usano comunemente lattoni acil-omoserina (AHL) o altre molecole derivate dalla *S*-adenosilmetionina come AI. Gli AHL sono sintetizzati dagli enzimi AHL sintasi, i più comuni sono sintasi di tipo LuxI, che sono stati trovati espressi in centinaia di specie batteriche. Una volta sintetizzati all'interno della cellula, gli AHL diffondono o vengono trasportati attraverso le membrane interna ed esterna per entrare in altre cellule vicine dove si legano ai loro recettori, che sono fattori di trascrizione citoplasmatica. I

recettori più comuni sono i recettori di tipo LuxR; in assenza di una molecola di AHL questi recettori non si ripiegano e si degradano rapidamente; tuttavia, una volta che una molecola AHL si lega al recettore di tipo LuxR, diventa stabile, dimerizza e si lega al DNA per guidare la trascrizione dei geni specifici del quorum (Alav *et al.*, 2018).

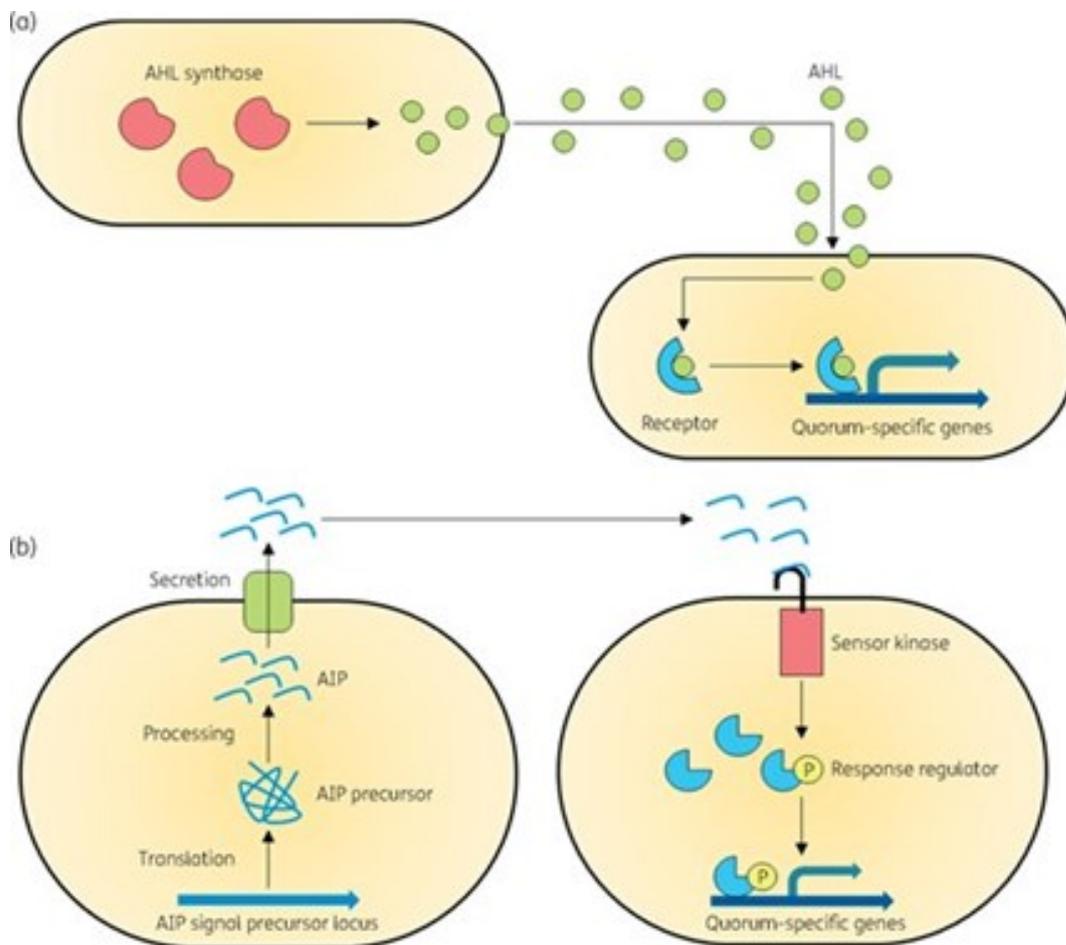


Figura 9. Sistemi QS (a) Nei batteri Gram-negativi, uno degli esempi più comuni di QS riguarda la sintesi di AHL da parte di AHL sintasi. Gli AHL vengono rilevati dai recettori intracellulari che funzionano come fattori di trascrizione per guidare la trascrizione dei geni specifici del quorum. (b) Nei batteri Gram-positivi, il QS è mediato da peptidi autoinduttori (AIP), che vengono sintetizzati come precursori e infine secreti attivamente come AIP maturi. La cellula è in grado di rilevare alte concentrazioni di AIP grazie ad una chinasi sensore che fosforila un regolatore della risposta, che guida la trascrizione dei geni specifici del quorum (tratto da Alav et al., 2018).

I batteri Gram-positivi generalmente impiegano oligopeptidi, collettivamente indicati come peptidi autoinduttori (AIP), come molecole segnale per il QS. All'interno delle cellule, gli AIP vengono sintetizzati come precursori per formare AIP maturi nel momento in cui vengono secreti attivamente dalla cellula nell'ambiente extracellulare. Una volta che la densità della popolazione cellulare aumenta oltre un certo punto, gli AIP raggiungono una concentrazione di soglia richiesta per il rilevamento e si legano a una proteina chinasi sensore legata alla membrana, determinandone l'autofosforilazione a livello di un residuo di istidina. La chinasi sensore attivata trasferisce quindi il gruppo fosfato a un residuo di acido aspartico di una proteina intracellulare che funge da regolatore della risposta, determinandone la fosforilazione (Alav *et al.*, 2018). Tale proteina fosforilata andrà a regolare la trascrizione di specifici geni.

Recentemente, diversi studi hanno dimostrato che la mancata espressione delle pompe di efflusso può alterare la formazione di biofilm (Sun *et al.*, 2014).

Diversi studi suggeriscono infatti che le pompe di efflusso potrebbero avere almeno quattro ruoli diversi nella formazione del biofilm:

- Mediare l'efflusso di EPS e/o di molecole del QS e del quorum quenching (QQ), cioè di molecole che interferiscono con la comunicazione cellulare, per

facilitare la formazione della matrice del biofilm e regolare il QS, rispettivamente;

- Regolare indirettamente i geni coinvolti nella formazione del biofilm;
- Mediare l'efflusso di molecole nocive, come antibiotici e intermedi metabolici;
- influenzare l'aggregazione cellulare promuovendo o prevenendo l'adesione alle superfici e ad altre cellule (Figura 10).

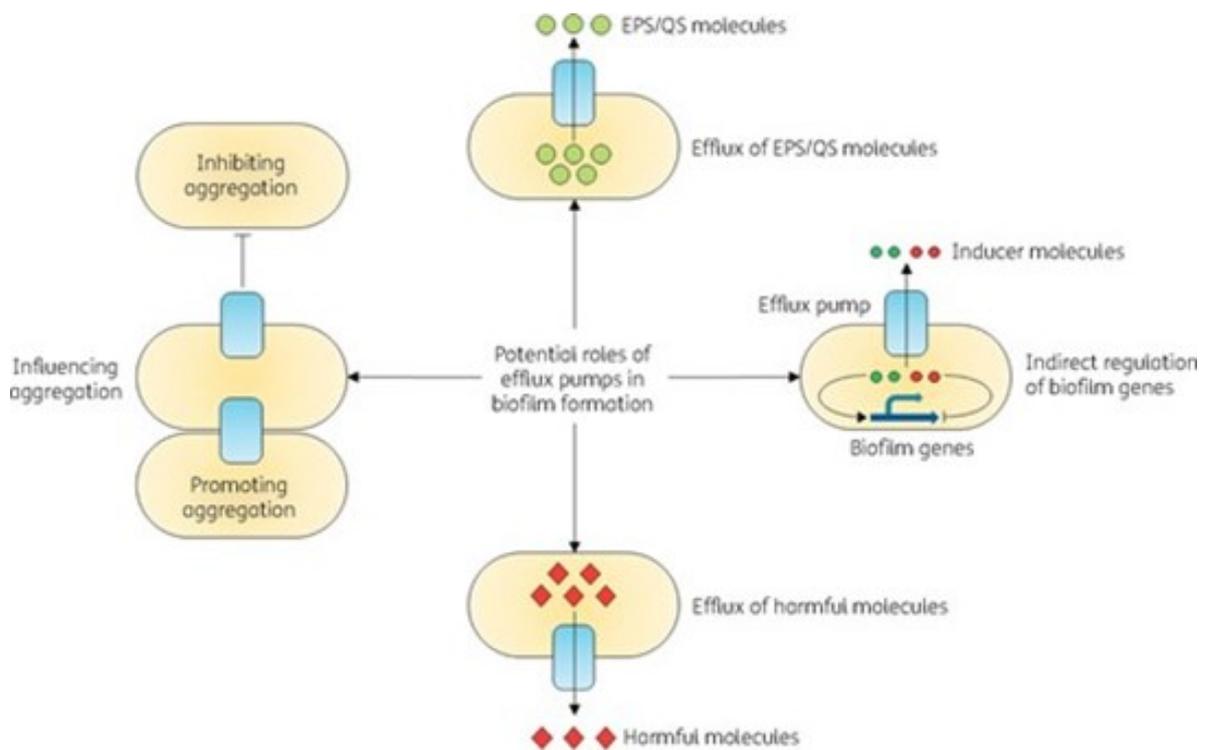


Figura 10. *Ruoli della pompa di efflusso nella formazione di biofilm (tratto da Alav et al., 2018).*

1.5.1 Ruolo delle pompe di efflusso

Il ruolo delle pompe di efflusso nella formazione del biofilm di *P. aeruginosa* è stato suggerito in numerosi studi. Come detto in precedenza, il QS è necessario per lo sviluppo di biofilm di *P. aeruginosa*, e quindi le pompe di efflusso possono svolgere un ruolo nel trasporto di componenti importanti come gli AHL richiesti per la formazione di biofilm. Uno dei primi studi ha dimostrato che cellule wild type (WT) di *P. aeruginosa* trattate con azide, un inibitore del gradiente protonico della membrana citoplasmatica, mostravano un forte accumulo intracellulare di lattone *N*-3-ossodecanoil- L - omoserina (3OC12-HSL), un importante AHL in *P. aeruginosa*, suggerendo il coinvolgimento dell'efflusso attivo. Inoltre, anche i mutanti di *P. aeruginosa* privi della pompa di efflusso mexAB-oprM mostravano un forte accumulo intracellulare di 3OC12-HSL e una ridotta formazione di biofilm. Questo studio suggeriva che 3OC12-HSL è un substrato naturale della pompa MexAB-OprM coinvolta nel suo efflusso. Alcuni anni dopo, è stato dimostrato che il macrolide azitromicina riduce la formazione di biofilm interferendo con la produzione di 3O12-HSL e di *N* - butirril- L - omoserina lattone (C4-HSL), suggerendo che sia 3OC12-HSL che C4-HSL svolgono un ruolo significativo nella formazione del biofilm. Ciò è stato confermato dall'aggiunta di entrambe le molecole in presenza di azitromicina, che provocava un significativo recupero della

formazione di biofilm. Quindi, è evidente che la pompa MexAB-OprM svolge un ruolo importante nel QS di *P. aeruginosa* guidando l'efflusso degli AHL, come 3OC12-HSL, necessari per la formazione di biofilm.

Alcuni studi si sono soffermati sugli effetti della iper-espressione delle pompe di efflusso sulla formazione di biofilm di *P. aeruginosa*. Per esempio, mutanti *nalB* e *nfxB* di *P. aeruginosa*, che sovraesprimono rispettivamente i sistemi di efflusso MexAB-OprM e MexCD-OprJ, non hanno mostrato alcun difetto nella formazione del biofilm. Infatti, i ceppi mutanti *nalB* mostravano la capacità di formare un biofilm significativamente più denso rispetto al ceppo WT. Come accennato in precedenza, la pompa MexAB-OprM svolge un ruolo nell'efflusso di 3OC12-HSL, e quindi la sovraespressione della pompa MexAB-OprM nei mutanti *nalB* può consentire un maggiore efflusso di AHL per mediare una rapida formazione di biofilm, il che potrebbe spiegare il più denso biofilm formato da *mutanti nalB* (Sanchez *et al.*, 2002).

Un altro studio ha riportato che i mutanti che sovraesprimono la pompa MexEF-OprN mostravano una compromissione della formazione di biofilm. MexEF-OprN regola l'efflusso di 4-idrossi-2-eptilchinolina, un precursore della molecola *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS), che è uno degli AI utilizzati da *P. aeruginosa* per facilitare il QS. La sovraespressione di MexEF-OprN potrebbe ridurre la concentrazione intracellulare dei segnali QS

in una singola cellula o gruppo di cellule diminuendo la sua risposta al quorum sensing, il che comporterebbe una compromissione della formazione del biofilm (Favre-Bonté *et al.*, 2003).

Diversi studi hanno anche riportato che l'espressione delle pompe di efflusso aumenta nei biofilm di *P. aeruginosa*. Nel lavoro di Waite *et al.* (2005) è stato correlato il livello di trascrittomi di colture planctoniche con lo sviluppo di biofilm. È stato osservato che l'espressione dei geni PA2114, PA4502, PA4505 e PA4506 coinvolti in sistemi di efflusso era sovraregolata di > 2,5 volte durante la crescita di biofilm rispetto alla crescita in forma planctonica. Il gene P2114 codifica per un presunto trasportatore MFS e i geni PA4502, PA4505 e PA4506 codificano ciascuno componenti di presunti trasportatori ABC, con specificità di substrato sconosciute; pertanto, il ruolo di queste pompe nella formazione di biofilm rimane ancora sconosciuto (Alav *et al.*, 2018).

Zhang e Mah (Zhang *et al.*, 2008) hanno descritto una nuova pompa di efflusso ABC, codificata dai geni PA1874–1877, che è stata trovata espressa a livelli più elevati nei ceppi di *P. aeruginosa* in biofilm rispetto a quelli in forma planctonica. Inoltre, questa pompa ha dimostrato di conferire resistenza agli aminoglicosidi e alla ciprofloxacina nelle cellule del biofilm, ma non nelle cellule planctoniche. Pertanto, questa pompa di efflusso può svolgere un ruolo nella antibiotico-resistenza specifica del biofilm.

Recentemente, uno studio ha riportato che il sistema di efflusso MexGHI-OpmD di *P. aeruginosa* era coinvolto nel trasporto del composto endogeno antimicrobico e reattivo 5-metilfenazina-1-carbossilato (5-Me-PCA). Inoltre, è stato dimostrato che tale composto 5-Me-PCA era necessario per la morfogenesi dei biofilm del ceppo WT. È stato proposto che il 5-Me-PCA possa essere impiegato dalle cellule nelle aree ipossiche dei biofilm per il bilanciamento redox, contribuendo alla sopravvivenza delle cellule. In precedenza, era stato anche dimostrato che, MexGHI-OpmD facilita il QS in *P. aeruginosa*. E' stato anche riportato che ceppi mutanti di *P. aeruginosa* privi dei geni *mexI* e *opmD* non erano in grado di sintetizzare 3-oxo-C12-HSL e PQS. Resta da indagare se MexGHI-OpmD controlli l'efflusso di questi AI, ma questi studi suggeriscono che tale pompa svolga un ruolo essenziale nel QS e nella virulenza di *P. aeruginosa* e quindi possa svolgere un ruolo anche nella formazione di biofilm (Alav *et al.*, 2018).

1.5.2 Effetti degli EPI sulla formazione del biofilm

Come discusso in precedenza, le pompe di efflusso potrebbero interferire in vario modo con la formazione di biofilm: l'inibizione della loro funzione potrebbe quindi inibire la formazione di biofilm. I composti che inibiscono l'attività delle pompe di efflusso sono noti come EPI (*Efflux Pump Inhibitors*). Diversi studi hanno dimostrato che diversi EPI riducono significativamente la formazione di biofilm in alcune specie batteriche. Uno dei primi EPI studiati è il carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), un inibitore della forza motrice protonica (PMF) in grado di ridurre significativamente la formazione di biofilm da parte di isolati epidemici di *P. aeruginosa*. Nel lavoro di Kvist *et al.* (2008) si riporta che l'aggiunta delle EPI 1-(1-naptilmetil) piperazina (NMP), PABN e tioridazina riduceva significativamente la formazione di biofilm da parte dei ceppi di *E. coli* F18, del ceppo uropatogeno di *E. coli* 83972 e del ceppo *K. pneumoniae* i222-86, in quasi tutti i casi. Il trattamento con 50 mg/L di tioridazina o PABN riduceva la formazione di biofilm fino all'80% rispetto ai controlli senza EPI, mentre il trattamento con 100 mg/L di NMP da solo non aveva alcuna significativa attività anti-biofilm rispetto al controllo. Inoltre, la combinazione di più EPI dimostrava un'azione sinergica contro la formazione di biofilm rispetto ai controlli. Ad esempio, la combinazione di tioridazina e PABN riduceva la

formazione di biofilm da parte dei ceppi di *E. coli* e *K. pneumoniae* del >95% rispetto al controllo. È interessante notare che l'NMP mostrava attività anti-biofilm solo se utilizzato in tandem con un altro EPI, come la tioridazina.

Il PABN quando combinato con diversi chelanti del ferro, come acido acetoidrossamico, EDTA e 2,2-dipiridile, mostrava un'attività sinergica anti-biofilm contro *P. aeruginosa* rispetto al solo trattamento con PABN. La combinazione di PABN ed EDTA è risultata la più promettente, causando una diminuzione di 2,5 volte della biomassa del biofilm rispetto al controllo. Il ferro funziona come un segnale importante per la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* e quindi i chelanti del ferro prevengono la formazione del biofilm riducendo la concentrazione di ferro disponibile per le cellule.

Nello studio di Baugh et al (2014) è riportato che gli EPI CCCP, clorpromazina e PABN possono ridurre la formazione di biofilm da parte di *E. coli*, *S. aureus* e *S. enterica* sierotipo Typhimurium in condizioni statiche e di flusso. In questo studio, 2 mg/L di CCCP si sono dimostrati sufficienti per ridurre di 5 volte la formazione di biofilm di *S. aureus* e 16 mg/L di PABN sono stati sufficienti per prevenire la formazione di biofilm da parte di *E. coli*. *P. aeruginosa* richiedeva concentrazioni molto elevate di EPI per prevenire la formazione di biofilm. Tuttavia, tutti e tre i composti testati erano efficaci a concentrazioni al di sotto della loro MIC. Pertanto, agivano come

agenti anti-biofilm per ridurre la formazione di biofilm piuttosto che come agenti antibatterici.

CCCP è un inibitore di efflusso ad ampio spettro che inibisce tutte le pompe di efflusso che dipendono dal PMF per funzionare. Inoltre, il CCCP ha effetti sulla permeabilità della membrana, che a sua volta influenza altri importanti processi all'interno delle cellule batteriche, tra cui la divisione cellulare e il metabolismo. Questo potrebbe spiegare perché il CCCP è più efficace nel ridurre la formazione di biofilm rispetto ad altri EPI, poiché presumibilmente agisce con modalità diverse per interrompere la formazione di biofilm. Tuttavia, ciò significa anche che è difficile concludere se l'attività anti-biofilm del CCCP sia direttamente dovuta alla sua capacità di inibire le pompe di efflusso. D'altra parte, in diversi studi è stato riportato che il PABN è uno specifico inibitore competitivo delle pompe RND, che agisce riconoscendo e legandosi allo stesso sito di legame dei substrati delle pompe. Tuttavia, il PABN permeabilizza la membrana esterna dei batteri Gram-negativi e può anche avere altri effetti cellulari nei batteri. Allo stesso modo, il PABN può anche influenzare la permeabilità dei batteri Gram-positivi, il che potrebbe spiegare perché può anche inibire la formazione di biofilm di *S. aureus*.

Come discusso in precedenza, è stato dimostrato che alcuni EPI esibiscono attività anti-biofilm grazie alla loro capacità di inibire l'efflusso. Tuttavia,

esistono numerosi altri EPI isolati da fonti naturali e da fonti sintetiche che devono ancora essere testati per l'attività anti-biofilm. In effetti, è evidente che gli EPI hanno il potenziale per essere utilizzati come agenti anti-biofilm e utilizzati insieme agli antibiotici per superare la resistenza agli antibiotici. L'unico EPI ad entrare in uno studio clinico è stato MP-601205, che è stato testato in pazienti con fibrosi cistica durante uno studio di Fase 1b. Tuttavia, lo studio è stato infine interrotto a causa di problemi legati alla tossicità del composto. Pertanto, nessuno degli EPI sviluppati finora è stato autorizzato per uso clinico. La ragione principale di ciò è la tossicità, che deriva dal fatto che la maggior parte degli EPI richiedono dosi elevate per essere efficaci, limitandone l'uso sistemico (Alav *et al.*, 2018).

2. SCOPO DELLA TESI

La resistenza ai farmaci antimicrobici è diventata un problema a livello globale, soprattutto se si considera la capacità dei microorganismi di sviluppare in tempi relativamente brevi una resistenza contro gli antibiotici attualmente in uso. Tutto ciò ha spinto a cercare una soluzione alternativa che potesse porre rimedio a tale problema. Uno degli approcci più quotati è stato quello dell'utilizzo di molecole non antibiotiche somministrate insieme agli antibatterici per andare a ripristinare un fenotipo sensibile nei ceppi batterici resistenti.

La pompa MexXY-OprM è uno dei meccanismi di resistenza che *P. aeruginosa* utilizza per eludere l'effetto degli aminoglicosidi.

Lo scopo di questa tesi è stato valutare l'effetto di 3 derivati della Berberina come nuovi inibitori della pompa di efflusso MexXY-OprM nei confronti di 10 ceppi di *P. aeruginosa* resistenti alla tobramicina. Tali composti sono stati testati in combinazione con la tobramicina per verificare l'efficacia di questi composti nel ripristinare la sensibilità dei ceppi agli aminoglicosidi e nel contrastare la produzione di biofilm.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi batterici, terreni, reagenti

3.1.1 Ceppi batterici

I ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* utilizzati sono stati coltivati in piastre di Luria Bertani (LB) o *Pseudomonas* agar, e conservati come stock in LB brodo supplementato con glicerolo al 20% a -80° C. Per il ceppo *P. aeruginosa* K1525 + pYM004 sono state usate piastre di LB agar supplementate con carbenicillina 200 µg/ml, per il mantenimento del plasmide stesso.

I ceppi utilizzati sono:

- ***P. aeruginosa* K767:** *P. aeruginosa* PAO1 wild type;
- ***P. aeruginosa* K1525:** *P. aeruginosa* K767 delecto dell'operone *mexXY*;
- ***P. aeruginosa* K1525 + pYM004:** *P. aeruginosa* K1525 complementato dell'operone *mexXY*, portato dal plasmide pYM004.
- ***P. aeruginosa* PA7:** Ceppo di *P. aeruginosa* di origine clinica caratterizzato da resistenza ad alto livello alla tobramicina.
- ***P. aeruginosa* C6, C15, C25, C30, C31, C61, C104, AR48, NC04, NC06:**

ceppi clinici di *P. aeruginosa* ottenuti da pazienti con fibrosi cistica, con diversi livelli di resistenza alla tobramicina privi di meccanismi di resistenza al

farmaco se non quello dovuto all'espressione della pompa di efflusso MexXY-OprM.

3.1.2 Terreni di coltura

Sono stati utilizzati diversi terreni di coltura: il Luria Bertani (LB), lo *Pseudomonas* agar, il Muller Hinton Broth II (MHII).

L'LB è un terreno ricco che è stato usato per la crescita e il mantenimento dei ceppi. Lo *Pseudomonas* agar è un terreno selettivo usato per la crescita di *Pseudomonas*. Il Mueller Hinton Broth II è un terreno ricco, addizionato di calcio (20-25 mg/l) e magnesio (10-12,5 mg/l), usato per i test di sensibilità agli antibiotici di batteri aerobi Gram-negativi e Gram-positivi. Tutti i terreni di coltura sono stati forniti dalla ditta Oxoid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), sono stati preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice e sterilizzati in autoclave a 121°C per 15 minuti.

3.1.3 Reagenti

Nei saggi svolti sono stati utilizzati diversi reagenti. Come antibiotico è stata usata la tobramicina risospesa in acqua alla concentrazione di 20 mg/ml fornita da Sigma-Aldrich (Saint Luis, Missouri, USA). Sono stati usati il tampone fosfato (PBS) e il Cristalvioletto (Gram's crystalviolet solution, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) per i saggi di produzione di biofilm. L'alcaloide Berberina è stato fornito dal Dipartimento di Chimica dell'UNIVPM.

I test eseguiti hanno previsto l'utilizzo di tre composti derivati dalla berberina sintetizzati secondo Giorgini et al. 2021. I 3 composti sono 13-(2-metilbenzil)-berberina (o-CH₃-berberina), 13-(benzil)-berberina (p-BZ-berberina), 13-(4-nitrobenzil)-berberina (p-NO₂-berberina) che sono stati sintetizzati dal gruppo di *modeling* molecolare della Prof.ssa Galeazzi (Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, UNIVPM), e conservati come soluzioni stock in DMSO ad una concentrazione di 20 mg/ml.

L' o-CH₃-berberina presenta un gruppo benzilico sul carbonio C13 della berberina e un gruppo metile in posizione orto sull'anello benzilico.

Il p-BZ-berberina ha un gruppo benzilico sul carbonio C13 della berberina.

Il p-NO₂-berberina presenta un gruppo benzilico sul C13 della berberina; sul gruppo benzilico è presente il sostituente NO₂ in posizione para. Questi sono i composti testati come EPI.

3.2 Determinazione della MIC

La determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC) è stata effettuata con il metodo della microdiluizione in brodo in piastre microtiter a 96 pozzetti utilizzando concentrazioni scalari di tobramicina da 256 a 0,25 µg/ml. La MIC è stata valutata anche in presenza di berberina e del composto o-CH₃-Ber alla concentrazione di 80 µg/ml per la berberina e 40 µg/ml per l'o-CH₃-Ber.

Preparazione dell'inoculo batterico

La mattina precedente l'allestimento della piastra per la preparazione della MIC, trasferire delle colonie del ceppo da testare in una provetta contenente Mueller Hinton Broth e mettere in termostato a 37°C per la crescita overnight. Il giorno successivo standardizzare le brodocolture in brodo MHII ad una OD (625 nm) di 0,1 per poi diluire l'inoculo batterico 1:100 in brodo MHII, mescolando 10 µl della sospensione batterica standardizzata (OD = 0,1) con 990 µl di brodo MHII.

Allestimento della piastra

- Inoculare 50 µl di brodo Mueller Hinton II (MHII) sterile in ciascun pozzetto della microtiter.

- Preparare una soluzione di tobramicina ad una concentrazione doppia rispetto a quella più elevata che si vuole saggiare (256 µg/ml), diluendo la soluzione madre in brodo MHII.
- Inoculare 50 µl della soluzione di antibiotico preparata nelle prime due colonne della piastra microtiter.
- Mescolare il contenuto presente nella seconda colonna, prelevare 50 µl e passarli nella terza colonna. Procedere allo stesso modo per le successive diluizioni fino alla penultima colonna e scartare gli ultimi 50 µl di soluzione (l'ultima colonna serve come controllo di crescita e quindi non va aggiunto l'antibiotico). Al termine di questa procedura tutte le colonne contengono una concentrazione doppia di antibiotico rispetto a quelle finali da saggiare, che si ottengono quando vengono aggiunti in ciascun pozzetto 50µl di inoculo batterico standardizzato in precedenza.

Determinazione della MIC dell'associazione tobramicina- inibitori di MexXY-oprM

Sono stati testati i composti Berberina (Ber) e o-CH₃-Ber.

La mattina precedente l'allestimento della piastra per la preparazione della MIC, trasferire delle colonie del ceppo da testare in una provetta contenente

Mueller Hinton Broth e mettere in termostato a 37°C per la crescita overnight.

Il giorno successivo standardizzare le brodocolture in brodo MHII ad una OD (625 nm) di 0,1.

- Inoculare 50 µl di MHII in ogni pozzetto della piastra tranne che in quelli della prima colonna.
- Preparare una soluzione di tobramicina in MHII ad una concentrazione doppia rispetto a quella massima che si vuole testare e inoculare 50 µl nei pozzetti delle prime due colonne.
- Effettuare le diluizioni dell'antibiotico a partire dalla seconda colonna come descritto precedentemente lasciando l'ultima colonna priva di antibiotico per il controllo di crescita.
- Preparare una soluzione contenente MHII brodo + EPI (a concentrazione doppia rispetto a quella massima da testare) + inoculo batterico standardizzato ($OD_{625} = 0,1$) e inoculare tutti i pozzetti di una singola riga.
- L'ultima riga della piastra viene inocolata solo con l'inoculo batterico standardizzato per verificare la MIC di tobramicina del ceppo esaminato.
- Incubare a 37°C overnight.

Al termine dell'incubazione, per ogni ceppo si valuta qual è la più bassa concentrazione di antibiotico nella combinazione con l'EPI alla quale non si osserva la crescita batterica.

Affinché il test sia valido si deve osservare sempre crescita nell'ultima colonna priva di antibiotico e la MIC di tobramicina testata da sola deve essere confermata. Per interpretare i risultati vanno confrontati i risultati di MIC ottenuti con l'antibiotico da solo e quelli dell'antibiotico combinato con l'EPI. Una riduzione della MIC di tobramicina (in presenza di EPI) di almeno 4 volte era indicativo di un effetto sinergico tra l'antibiotico e il composto (Giorgini *et al.*, 2021).

3.3 Test a “scacchiera” (Checkerboard assay)

Il test del checkerboard è uno dei metodi utilizzati per andare a valutare l'effetto di due o più molecole utilizzate in combinazione e verificare se hanno un effetto sinergico.

Il test a scacchiera è stato eseguito andando ad inoculare concentrazioni scalari della tobramicina e degli EPI da testare in piastre mictotiter da 96 pozzetti. Il fine è quello di andare a verificare la sinergia tra l'antibiotico e gli EPI utilizzati in combinazione.

I tre composti (o-CH₃-Ber, p-BZ-Ber, p-NO₂-Ber) sono stati testati sui ceppi di *Pseudomonas* citati precedentemente.

I composti sono stati utilizzati nel range di concentrazioni da 320 µg/ml a 10 µg/ml, la tobramicina è stata testata in un range variabile in base al valore di MIC precedentemente mostrato dai diversi ceppi.

La piastra è stata allestita in modo tale da avere concentrazioni scalari di antibiotico nelle colonne e concentrazioni scalari di composto EPI nelle righe.

Allestimento della piastra

Innanzitutto, 50 µl di terreno MHII vengono inoculati in tutti pozzetti della microtiter ad eccezione di quelli della prima colonna.

Le soluzioni di antibiotico e dei composti sono state preparate ad una concentrazione pari a 4X il valore massimo del range da testare in MHII brodo e poi diluite serialmente in base 2 in una piastra microtiter a 96 pozzetti, in modo da diluire l'antibiotico in senso orizzontale e i composti in senso verticale.

A questo scopo quindi, 50 µl della soluzione di antibiotico sono stati inoculati nei pozzetti delle prime due colonne della piastra e sono state effettuate le diluizioni, come precedentemente descritto per la determinazione della MIC. Successivamente, 50µl di MHII contenente l'EPI sono stati inoculati in tutti i pozzetti della prima riga della piastra e sono state effettuate diluizioni seriali in senso verticale. Pertanto, a partire dalla prima riga fino alla terz'ultima, le concentrazioni di EPI e di DMSO si dimezzano. Tuttavia, per far sì che il DMSO sia alla stessa concentrazione in tutti i pozzetti (cioè pari a 1,6%) volumi scalari di DMSO vengono aggiunti dalla seconda alla terz'ultima riga in modo che la concentrazione finale sia 1,6% in tutta la microtiter. Il DMSO viene aggiunto insieme all'inoculo batterico standardizzato.

In ogni piastra viene valutato anche l'effetto del solvente dei composti (DMSO) alla concentrazione massima presente in soluzione, equivalente al 1.6%. Quindi, nella penultima riga vengono aggiunti 50 μ l di DMSO 4X (6,4%) ai 50 μ l di brodo MHII cosicché la concentrazione di DMSO finale sia 3,2% che verrà dimezzata ulteriormente dopo l'aggiunta dell'inoculo batterico.

L'ultima riga della piastra rappresenta il controllo della MIC dell'antibiotico. Quindi i pozzetti vengono inoculati con 50 μ l di MHII contenente solo le concentrazioni scalari dell'antibiotico.

La sospensione batterica del ceppo standardizzato ($O.D._{625nm}=0.1$) viene diluita 1:10 in MHII contenente DMSO nelle quantità opportune, come detto precedentemente. Dispensare 50 μ l dell'inoculo in tutti i pozzetti della microtiter.

Incubare a 37°C per 24h.

La più bassa concentrazione di composto in grado di causare una riduzione della MIC di antibiotico di almeno 4 volte è stata considerata come concentrazione attiva del composto e capace di agire in maniera sinergica con l'antibiotico.

3.4 Produzione di Biofilm

Per valutare la capacità dei 10 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* di formare il biofilm è stato eseguito il saggio di produzione. Questa tecnica, eseguita su piastra microtiter con fondo piatto, prevede la fissazione del biofilm batterico sul fondo della piastra, la colorazione con cristalvioletto, e la misurazione della densità ottica (OD_{690}) mediante lettore di piastra (FLUOstar Omega Microplate Reader, BMG Labtech, Offenburg, Germany).

Il primo giorno i ceppi da saggiare sono stati seminati in 5 mL di LB brodo e incubati over night a 37 °C.

Il giorno seguente le colture sono state diluite 1:10 in LB e successivamente standardizzate alla $OD_{645} = 0,1$.

Quindi sono stati distribuiti 200 μ L di ciascun ceppo in 6 pozzetti della piastra, lasciando una colonna vuota tra un ceppo e un altro; nell'ultima colonna è stato inserito il ceppo di controllo, *P. aeruginosa* K767 produttore di biofilm, mentre nell'ultima riga sono stati inoculati 200 μ L di LB per il bianco. La piastra è stata incubata a 37°C overnight.

Il terzo giorno sono stati eseguiti 3 lavaggi con 200 μ L di PBS per ogni pozzetto e in seguito la piastra è stata posta in stufa a 60°C per 1 ora senza coperchio.

Quindi è stato aggiunto cristal-violetto (100 μL /pozzetto) che veniva lasciato agire per 10 minuti a T ambiente. Dopo aver effettuato 3 lavaggi con 200 μL di acqua, si procedeva all'estrazione del cristalvioletto aggiungendo EtOH 95% (100 μL /pozzetto) per 10 minuti a T ambiente. Infine, si effettuava la lettura a 690 nm.

Per la lettura è stato utilizzato il lettore di piastre OMEGA (BMG LABTECH, Ortenberg, Germania). La piastra veniva posta nel cassetto di lettura priva del suo coperchio e lo strumento effettuava la lettura di ogni singolo pozzetto in base all'area predefinita dall'utente. I risultati venivano elaborati dal software e mostrati in un documento Excel. Ad ogni valore ottenuto veniva sottratto il valore del bianco. In base alle letture ottenute per ciascun ceppo, veniva valutata la capacità dei ceppi testati di produrre biofilm suddividendoli in quattro categorie:

- forti produttori (FP)
- moderati produttori (MP)
- deboli produttori (DP)
- non produttori (NP)

La classificazione dei ceppi nelle quattro categorie veniva fatta determinando il valore soglia di densità ottica (cut-off, OD_c). Questo era calcolato come tre

volte la deviazione standard (DS) dei valori di assorbanza del bianco (OD_B) sommata al valore medio della densità ottica del bianco, cioè $OD_C = 3DS_B + OD_{mB}$.

Dopo aver calcolato i valori medi di densità ottica per ogni ceppo (OD_m), la classificazione avveniva come riportato in tabella (Tabella 1)

Forte Produttore NP	Moderato Produttore MP	Debole Produttore DP	Non Produttore NP
$OD_m \leq OD_c$	$OD_c < OD_m \leq 2 \cdot OD_c$	$2 \cdot OD_c < OD_m \leq 4 \cdot OD_c$	$4 \cdot OD_c < OD_m$

Tabella 1. Criteri di classificazione dei produttori di biofilm

Per garantire l'affidabilità e la riproducibilità del metodo, il saggio è stato eseguito in triplicato.

3.5 Determinazione della MBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentration)

Il saggio MBEC è effettuato per verificare l'efficienza delle combinazioni tobramicina + EPI nell'eradicazione del biofilm. Sono state utilizzate piastre microtiter 96-well con coperchio con 96 peduncoli (Innovatech), ognuno corrispondente ad un pozzetto nella base della piastra. In seguito alla crescita del ceppo nel pozzetto inoculato, il biofilm si forma sulla superficie del peduncolo che si trova immerso nella coltura batterica. In questo saggio è stata valutata la capacità di eradicare il biofilm da parte della tobramicina, testata da sola in un range di concentrazione variabile in base alla MIC del ceppo, e in combinazione con due EPI differenti: la Berberina (80 µg/ml) oppure il derivato o-CH₃-Ber (40 µg/ml).

Il primo giorno la sospensione batterica di ciascun ceppo, in MHII, veniva standardizzata a $O.D._{625nm} = 0,1$. Per ciascun antibiotico (o combinazione testata) 150 µl della sospensione batterica standardizzata venivano inoculati nei pozzetti di due righe.

La piastra veniva incubata in termostato a 37°C overnight per consentire la formazione di biofilm sulla superficie dei peduncoli.

Il giorno seguente veniva allestita una nuova piastra con le combinazioni di antibiotico ed EPI nel seguente modo:

nelle prime due righe venivano inoculati 150 μ l di MHII contenente tobramicina a concentrazioni scalari ad eccezione dell'ultimo pozzetto di ogni riga lasciato privo di antibiotico, da utilizzare come controllo di crescita.

Nelle successive due righe si inserivano 75 μ l di MHII contenente tobramicina a concentrazioni scalari (doppie rispetto a quelle finali da testare) lasciando l'ultimo pozzetto privo di antibiotico, come sopra. Quindi venivano aggiunti in tutti i pozzetti tranne negli ultimi di ciascuna delle due righe, 75 μ l di Berberina 2X (160 μ g/ml).

Nelle ultime due righe si procedeva come le precedenti sostituendo la Berberina con il derivato o-CH₃-Ber 2X (80 μ g/ml).

Quindi il coperchio della vecchia piastra su cui si era formato il biofilm (adeso ai peduncoli) veniva prelevato e posizionato sulla nuova piastra così allestita e si incubava a 37°C overnight. In questo modo i peduncoli con il biofilm venivano a trovarsi immersi nel terreno contenente le diverse concentrazioni di tobramicina in presenza o in assenza di specifiche concentrazioni dei due EPI.

Il giorno successivo il coperchio veniva spostato su una nuova piastra in cui i peduncoli venivano immersi in 150 μ L di MHII brodo e la piastra veniva incubata in termostato a 37°C overnight.

Dopo l'incubazione, se il biofilm non è stato eradicato dalla precedente incubazione con l'antibiotico (con o senza EPI), si dovrebbe osservare intorbidimento del brodo nei pozzetti di ciascuna riga. La mancata crescita indica che nel biofilm, dopo il contatto con la specifica concentrazione di antibiotico o di antibiotico + EPI, non ci sono più cellule batteriche vive in grado di crescere e che il biofilm è stato eradicato.

In base ai pozzetti in cui non si osserva crescita si risale quindi alla più bassa concentrazione di antibiotico (o antibiotico + EPI) che inibisce la crescita batterica che corrisponde alla minima concentrazione eradicante il biofilm (MBEC).

3.6 Determinazione della MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration)

I ceppi clinici di *P. aeruginosa* produttori di biofilm analizzati in questo lavoro, sono stati sottoposti al test di inibizione della formazione del biofilm, un saggio che valuta qual è la concentrazione minima di antibiotico inibente la formazione del biofilm in presenza di concentrazioni fisse di Berberina (80 µg/ml) e o-CH₃-Ber (40 µg/ml). La concentrazione dell'antibiotico tobramicina era saggiata in un range di concentrazione variabile in base alla MIC del ceppo. Sono state utilizzate piastre microtiter 96-well con coperchio con 96 peduncoli (Innovatech), ognuno corrispondente ad un pozzetto nella base della piastra. Il biofilm si formerà esattamente sul peduncolo.

Il primo giorno la sospensione batterica veniva standardizzata in MHII a O.D._{625nm} = 0,1. Come per la determinazione della MBEC, per ogni condizione testata sono state allestite due righe della piastra inoculando 100 µl del ceppo standardizzato. La piastra è stata incubata per 24h a 37°C per favorire la crescita del biofilm.

Il giorno seguente si preparava una nuova piastra con le combinazioni di antibiotico + EPI da testare. Le prime due righe della piastra rappresentano il

controllo della MIC dell'antibiotico, per cui 100 µl di MHII sono stati dispensati in tutti i pozzetti delle prime due righe ad eccezione del primo e dell'ultimo. Nel primo pozzetto, sono stati inoculati 200 µl di MHII contenente tobramicina alla concentrazione massima da testare. Quindi 100 µl sono stati prelevati dal primo pozzetto e a partire dal secondo sono state eseguite diluizioni scalari in base due fino al terzultimo pozzetto. Il penultimo rappresenta il controllo di crescita del ceppo in assenza di antibiotico e l'ultimo pozzetto rappresenta il controllo di sterilità che viene lasciato vuoto e riempito di solo terreno il giorno successivo. Le due righe della tobramicina+Berberina e tobramicina+ o-CH₃-Ber sono state allestite inoculando 50 µl di MHII in tutti i pozzetti della riga ad eccezione del primo e dell'ultimo pozzetto. Nel primo pozzetto sono stati inoculati 100 µl di MHII contenente tobramicina ad una concentrazione doppia rispetto alla concentrazione massima da testare. L'ultimo pozzetto di ciascuna riga, anche in questo caso, è stato lasciato vuoto come controllo di sterilità. Quindi sono state eseguite diluizioni scalari dell'antibiotico prelevando 50 µl dal primo pozzetto della riga e procedendo come precedentemente descritto. Le concentrazioni di tobramicina desiderate si ottenevano in ciascun pozzetto della riga, quando 50 µl di MHII contenente l'EPI (a concentrazione doppia rispetto a quella finale) venivano aggiunti a tutti i pozzetti delle rispettive righe.

Il coperchio con i peduncoli veniva quindi prelevato dalla prima piastra e dopo il lavaggio dei peduncoli per 3 volte in H₂O sterile (utilizzando la base di un'altra piastra) veniva posizionato sulla piastra in cui erano state preparate le diluizioni e la piastra veniva incubata a 37°C per 24h.

Il range di concentrazioni di antibiotico da testare è circa quello della MIC.

Dopo l'incubazione, il coperchio con i peduncoli veniva di nuovo lavato 3 volte in H₂O sterile, poi trasferito in una piastra nuova preparata con 100 µl di brodo MHII in ogni pozzetto. La piastra era poi centrifugata a 805g per 20 minuti per permettere il distacco del biofilm dai peduncoli. Le piastre sono state lette in un lettore di piastre alla lunghezza d'onda di 625 nm prima (t₀) e dopo incubazione di 6 ore (t₁) a 37°C.

La MBIC corrisponde al primo pozzetto in cui l'assorbanza è $\leq 10\%$ dell'assorbanza del controllo di crescita senza antibiotico (nel penultimo pozzetto). Per validare il risultato si calcola il Biofilm Growth Control: la differenza di assorbanza tra il controllo di crescita a t₁ e a t₀ deve essere >0.05 .

4.RISULTATI

4.1 Determinazione della MIC dei ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*

Inizialmente è stata determinata la concentrazione minima inibente (MIC) di tobramicina per i 10 ceppi di *P. aeruginosa* presi in esame (C6, C15, C25, C30, C31, C61, C104, AR48, NC04, NC06) (Tabella 1). In base ai *breakpoints* della tobramicina riportati nelle tabelle del CLSI per la specie *P. aeruginosa*, 7 ceppi (C15, C25, C30, C61, C104, AR48, NC06) su 10 risultavano resistenti alla tobramicina con valori di MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$.

CEPPO	MIC $\mu\text{g/ml}$
	TOBRAMICINA
C6	2-4 (S)
C15	8-16 (I)/(R)
C25	16 (R)
C30	16 (R)
C31	8 (I)
C61	64 (R)
C104	32 (R)
AR48	32 (R)
NC04	4-8 (S)/(I)
NC06	16 (R)

Tabella 1: MIC di tobramicina dei 10 ceppi testati

R= ceppo resistente, I= ceppo intermedio, S= ceppo sensibile

4.2 Determinazione della MIC dell'associazione tobramicina /Berberina e derivati della Berberina (o-CH₃-Ber)

Nei ceppi clinici di *Pseudomonas aeruginosa* C6, C15, C25, C30, C31, C61, C104, AR48, NC04, NC06 la MIC di tobramicina è stata quindi determinata in presenza di Berberina e di o-CH₃-Ber. Il test è stato eseguito utilizzando una concentrazione fissa di EPI (80 µg/ml per la Berberina e 40 µg/ml per o-CH₃ - Ber) in combinazione con concentrazioni scalari di tobramicina.

I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 2 dove sono riportati i valori di MIC per la tobramicina, testata da sola o in combinazione con i due EPI.

CEPPO	MIC µg/ml		
	Tobramicina	T+Be	T+o-CH ₃ -Ber
C6	2-4 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
C15	8 -16 (I)/(R)	8 (I)	8 (I)
C25	16 (R)	1 (S)	1 (S)
C30	16 (R)	8 (I)	8 (I)
C31	8 (I)	8 (I)	8 (I)
C61	64 (R)	16 (R)	8 (I)
C104	32 (R)	8 (I)	8 (I)
AR48	32 (R)	8 (I)	16 (R)
NC04	4-8 (S)/(I)	0,5 (S)	0,5 (S)
NC06	16 (R)	4 (S)	1 (S)

Tabella 2. Confronto della MIC di tobramicina in assenza e in presenza dei composti Berberina e o-CH₃-Ber nei 10 ceppi testati.

In generale per la maggior parte dei ceppi si osserva una riduzione della MIC alla tobramicina in presenza dei due EPI, sebbene la piena sensibilità alla tobramicina ($MIC \leq 4 \mu\text{g/ml}$) venisse ripristinata solo in pochi ceppi. I risultati migliori sono stati ottenuti con i ceppi C6, C25, C61, NC04, NC06. In due ceppi (C15 e C31) la MIC di tobramicina non era invece affatto influenzata dalla presenza di tali composti.

4.3 Test a “scacchiera” Checkerboard

I test di checkerboard sono stati effettuati sui 10 ceppi di *P. aeruginosa* (C6, C15, C25, C30, C31, C61, C104, AR48, NC04, NC06) per valutare le migliori combinazioni sinergiche dell'antibiotico tobramicina con i 3 composti EPI derivati della Berberina: o-CH₃-Ber, p-NO₂-Ber, p-BZ-Ber.

Gli stessi esperimenti sono stati condotti anche sui seguenti ceppi di riferimento di *P. aeruginosa*:

- **K767:** *P. aeruginosa* PAO1 wild type
- **K1525:** *P. aeruginosa* K767 delecto dell'operone *mexXY*
- **K1525 + pYM004:** *P. aeruginosa* K1525 complementato dell'operone *mexXY*, portato dal plasmide pYM004.
- **PA7:** Ceppo di *P. aeruginosa* di origine clinica caratterizzato da resistenza ad alto livello alla tobramicina.

I composti sono stati testati ad una concentrazione massima di 320 µg/ml mentre la concentrazione massima della tobramicina variava a seconda della MIC del ceppo. La più bassa concentrazione di composto in grado di causare una riduzione della MIC di antibiotico di almeno 4 volte è stata considerata come la concentrazione attiva del composto, capace di produrre un effetto sinergico con l'antibiotico.

Nelle tabelle sottostanti (Tabella 3 e 4) sono riportati i risultati ottenuti.

CEPPO C6			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	0,5	0,25	1
160	0,25	0,25	1
80	0,25	0,5	1
40	0,25	1	1
20	0,5	1	2
10	1	1	2
DMSO	4	4	4
0	4	4	4

CEPPO AR48			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	2	4	4
160	2	8	4
80	2	8	4
40	4	16	8
20	8	16	16
10	16	16	16
DMSO	32	32	32
0	32	32	32

CEPPO C15			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	8	16	16
160	8	8	16
80	8	8	16
40	8	8	16
20	8	16	16
10	16	16	16
DMSO	>16	>16	>16
0	>16	>16	>16

CEPPO C30			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	8	8	16
160	8	8	8
80	4	8	8
40	4	8	8
20	8	8	8
10	8	8	8
DMSO	16	16	16
0	16	16	16

CEPPO C25			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	≤0,25	1	2
160	≤0,25	1	2
80	0,5	1	4
40	0,5	2	4
20	1	2	4
10	4	2	4
DMSO	16	16	16
0	16	16	16

CEPPO NC06			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	0,5	0,5	0,5
160	0,5	1	0,5
80	1	1	1
40	1	2	2
20	2	4	4
10	4	4	4
DMSO	16	16	16
0	16	16	16

Tabella 3. Risultati del checkerboard. In giallo sono riportate le riduzioni della MIC alla tobramicina di 4 volte in presenza della più bassa concentrazione di composto EPI, mentre in blu sono riportate le riduzioni che superano le 4 volte

CEPPO 104			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	2	2	4
160	2	2	8
80	2	4	8
40	2	4	16
20	4	8	16
10	8	8	16
DMSO	32	32	32
0	32	32	32

CEPPO NC04			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	pNO ₂ -Ber
320	0,5	0,5	1
160	0,25	0,5	1
80	0,25	0,5	1
40	0,5	0,5	2
20	1	1	2
10	2	1	2
DMSO	8	8	8
0	8	8	8

CEPPO C31			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	2	2	4
160	2	2	4
80	2	2	4
40	2	2	4
20	2	2	4
10	2	2	4
DMSO	8	8	8
0	8	8	8

CEPPO C61			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	2	4	16
160	2	4	16
80	2	4	16
40	2	8	32
20	4	8	32
10	8	8	32
DMSO	64	64	64
0	64	64	64

Tabella 4. Risultati del checkerboard. In giallo sono riportate le riduzioni della MIC alla tobramicina di 4 volte in presenza della più bassa concentrazione di composto EPI, mentre in blu sono riportate le riduzioni che superano le 4 volte

I risultati migliori si sono ottenuti nei ceppi C6, C25, C31, C61, C104, NC04, NC06 con il composto o-CH₃-Ber, per i quali si raggiunge una riduzione della MIC alla tobramicina di 4 volte utilizzando la concentrazione più bassa di composto (10 µg/ml). Solo nei ceppi C15, AR48, C30 per la riduzione della MIC di 4 volte occorre 20 µg/ml per C15 e AR48 e 40 µg/ml per C30.

Il composto p-BZ-Ber risulta avere un'attività paragonabile all' o-CH₃-Ber in quanto si otteneva una riduzione della MIC di tobramicina di 4 volte alla più bassa concentrazione di composto in tutti i ceppi tranne che nel C15 dove non si osservava una diminuzione significativa della MIC dell'antibiotico e per il ceppo AR48 dove per avere una diminuzione di 4 volte occorreva una concentrazione di composto più elevata (80 µg/ml).

Il composto p-NO₂-Ber, invece, portava ad una diminuzione della MIC di tobramicina di 4 volte alla più bassa concentrazione di composto (10µg/ml) solo nei ceppi C25, C30, C31, NC04, NC06, mentre negli altri ceppi o la MIC non si riduceva in maniera significativa o erano necessarie concentrazioni più elevate di composto per avere lo stesso effetto che gli altri due EPI avevano a concentrazioni inferiori.

Per quanto riguarda i ceppi **K767**, **K1525**, **K1525 + pYM004**, **PA7** si sono ottenuti i seguenti risultati (Tabella 5):

CEPPO PA7 (resistenza alta alla tobramicina)			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	8	64	64
160	8	32	128
80	16	32	128
40	16	64	256
20	16	64	256
10	32	128	256
DMSO	>256	256	256
0	>256	256	256

CEPPO K767 (wild type)			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	0,125	0,25	0,25
160	0,125	0,25	0,25
80	0,125	0,25	0,25
40	0,125	0,25	0,25
20	0,25	0,25	0,5
10	0,25	0,25	0,5
DMSO	1	1	0,5
0	1	1	0,5

CEPPO K1525 (deleto)			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	0,25	0,25	0,25
160	0,125	0,125	0,125
80	0,125	0,125	0,125
40	0,125	0,125	0,125
20	0,125	0,125	0,125
10	0,125	0,125	0,125
DMSO	0,25	0,25	0,25
0	0,25	0,25	0,25

CEPPO K1525+pYM004			
Conc.comp µg/ml	MIC µg/ml		
	o-CH ₃ -Ber	p-BZ-Ber	p-NO ₂ -Ber
320	0,125	0,25	0,25
160	0,125	0,125	0,25
80	0,06	0,25	0,25
40	0,125	0,25	0,25
20	0,125	0,25	0,5
10	0,25	0,25	0,5
DMSO	2	1	1
0	2	1	1

Tabella 5. Risultati del checkerboard. In giallo sono riportate le riduzioni della MIC alla tobramicina di 4 volte in presenza della più bassa concentrazione di composto EPI, mentre in blu sono riportate le riduzioni che superano le 4 volte

Nei ceppi K767 e K1525+pYM004 si ottiene una riduzione della MIC di tobramicina di 4 volte alla concentrazione più bassa dei composti o-CH₃-Ber e

p-BZ-Ber (10 µg/ml), mentre per il p-NO₂-Ber servono concentrazioni più alte per avere lo stesso effetto.

Nel ceppo PA7 si ottiene una riduzione della MIC della tobramicina di 4 volte con 10 µg/ml di o-CH₃-Ber e con 20 µg/ml di p-BZ-Ber.

Mentre, per il ceppo K1525, delecto della pompa di efflusso MexXY-OprM non si arriva ad una riduzione della MIC di tobramicina di 4 volte con nessuno dei tre composti a nessuna delle concentrazioni testate.

4.4 Produzione di biofilm

Il saggio per la produzione di biofilm è stato eseguito sui 10 ceppi di *P. aeruginosa* utilizzando il test del cristal violetto. I risultati sono stati confrontati con quelli che si ottengono dal ceppo di controllo *Pseudomonas aeruginosa* K767 produttore di biofilm. Con questo test, i ceppi in esame sono stati classificati in ceppi mediamente produttori di biofilm e in deboli produttori di biofilm. I ceppi mediamente produttori di biofilm sono il C6, C15, C30, C31, C104, NC04, AR48, K767. I ceppi che sono risultati deboli produttori di biofilm sono: C25, C61, NC06 (Grafico 1).

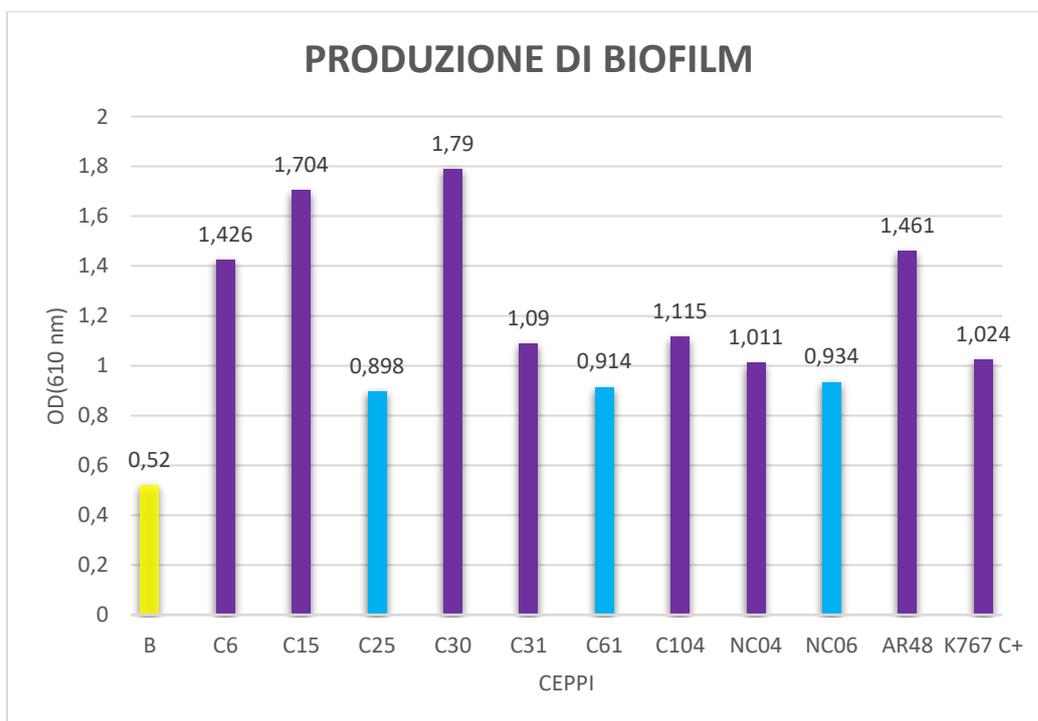


Grafico 1. In giallo è raffigurato il bianco, in blu i ceppi deboli produttori di biofilm e in viola i ceppi mediamente produttori di biofilm.

4.5 MBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentration)

Dopo aver verificato la produzione di biofilm da parte dei 10 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* è stato eseguito il saggio dell'MBEC al fine di verificare quale concentrazione di tobramicina fosse necessaria per eradicare il biofilm microbico e se la presenza di Berberina e o-CH₃-Ber, fosse in grado di abbassare il valore di MBEC.

La concentrazione massima testata di tobramicina è stata 2048 µg/ml mentre per gli EPI Berberina e o-CH₃-Ber è stata rispettivamente di 80 µg/ml e 40 µg/ml.

I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 6.

MBEC µg/ml			
CEPPO	Tobramicina	T+Ber	T+o-CH ₃ -Ber
C6	64	64	64
C15	2048	2048	2048
C25	512	512	256
C30	>2048	>2048	>2048
C31	≥2048	≥2048	≥2048
C61	2048	2048	2048
C104	2048	128	128
AR48	512	32	64
NC04	16	4	4
NC06	16	8	4

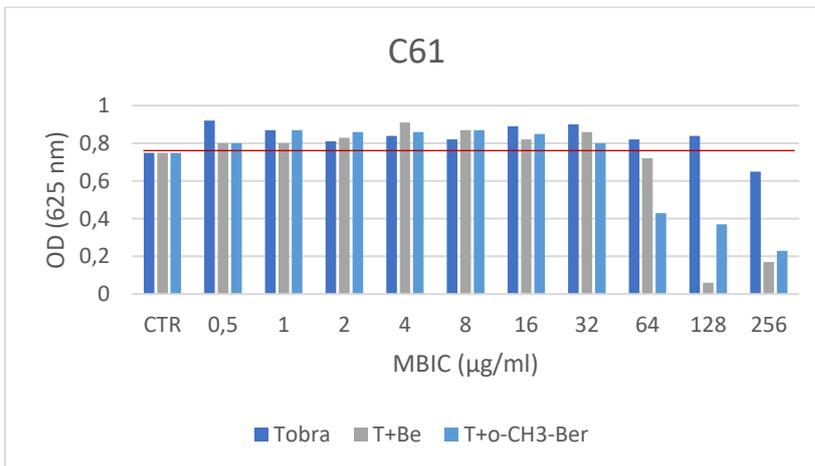
Tabella 6. Risultati MBEC della tobramicina in assenza e in presenza di Berberina e di o-CH₃-Ber nei confronti dei 10 ceppi testati

Nei ceppi C104, AR48, NC04, NC06 si sono ottenuti i risultati migliori in quanto si osserva una riduzione della MBEC fino a 16 volte sia in presenza di Berberina che di o-CH₃-Ber. Solo per questi ceppi l'aggiunta degli EPI permetteva alla tobramicina di eradicare il biofilm a concentrazioni più basse. Negli altri ceppi invece non si osservano differenze nella MBEC in presenza dei due EPI.

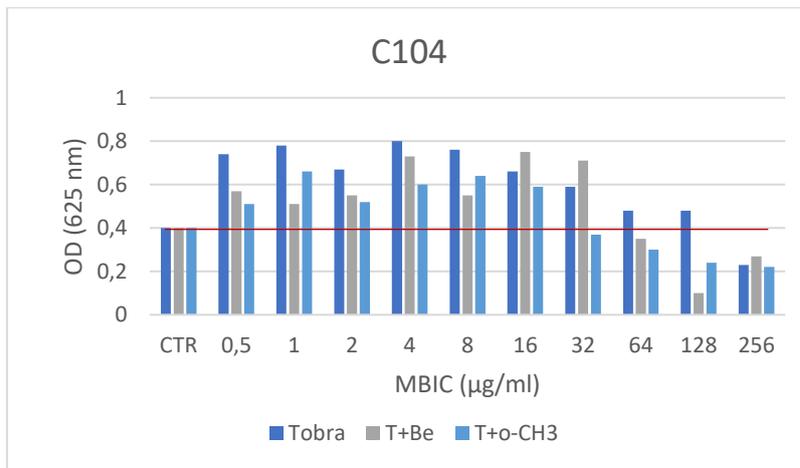
4.6 MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration)

È stato eseguito il test dell'MBIC sui ceppi di *P. aeruginosa* per verificare l'inibizione della formazione di biofilm in presenza di tobramicina, tobramicina + Berberina e tobramicina + o-CH₃-Ber.

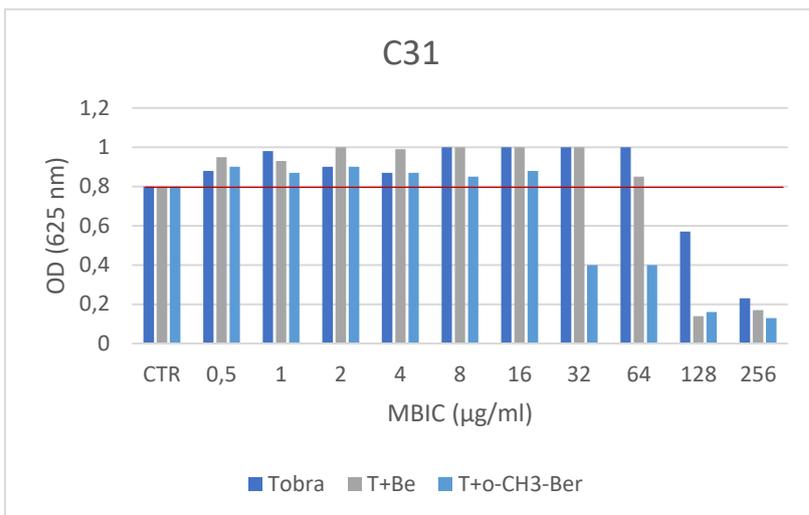
Durante la lettura dei risultati è stato stabilito come *cut-off* il valore di assorbanza del controllo di crescita senza antibiotico (CTR): valori al di sotto del *cut-off* indicavano una riduzione della crescita microbica e quindi inibizione della produzione di biofilm. La più bassa concentrazione di tobramicina (o della combinazione) alla quale la densità ottica era inferiore a quella del *cut-off* rappresentava la MBIC. I risultati ottenuti a seguito della lettura delle piastre sono rappresentati nei seguenti grafici.



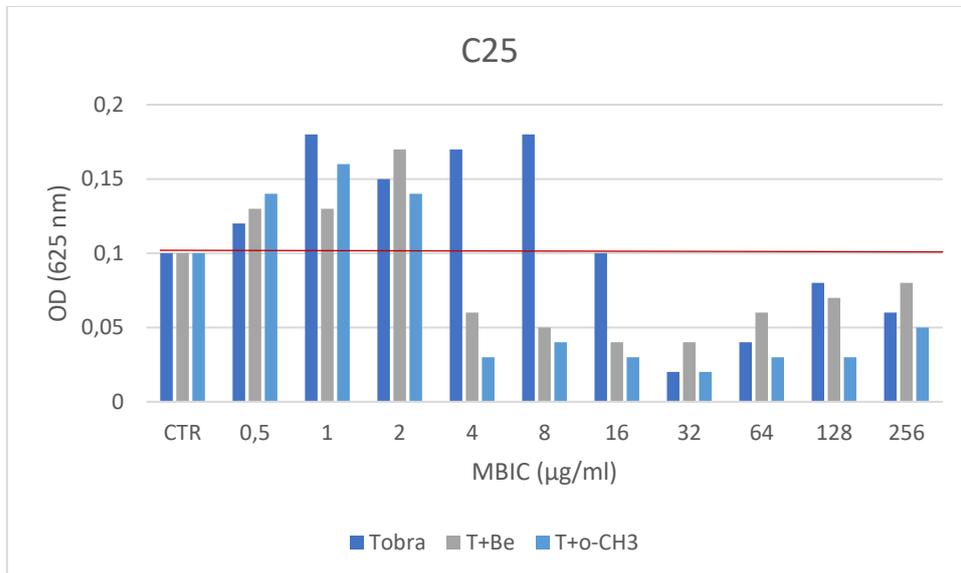
Nel ceppo C61, la MBIC cioè la concentrazione minima di tobramicina inibente la formazione di biofilm era pari a 256 $\mu\text{g/ml}$ e si riduceva di 4 volte (64 $\mu\text{g/ml}$) in presenza dei compisti EPI (Berberina e o-CH₃-Ber).



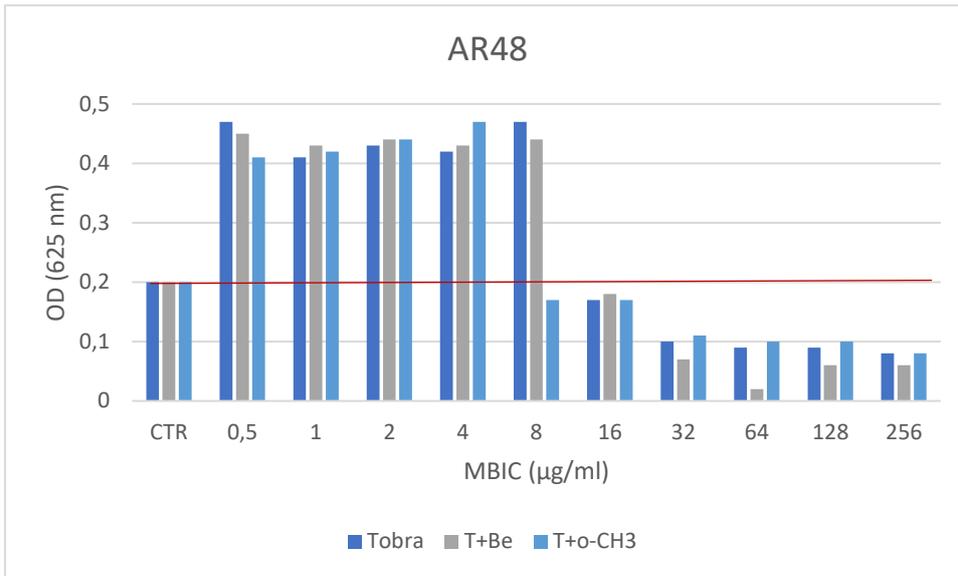
Anche nel ceppo C104 la MBIC era 256 $\mu\text{g/ml}$ e si riduceva di 4 volte in presenza del composto Berberina e di 8 volte in presenza del composto o-CH₃-Ber.



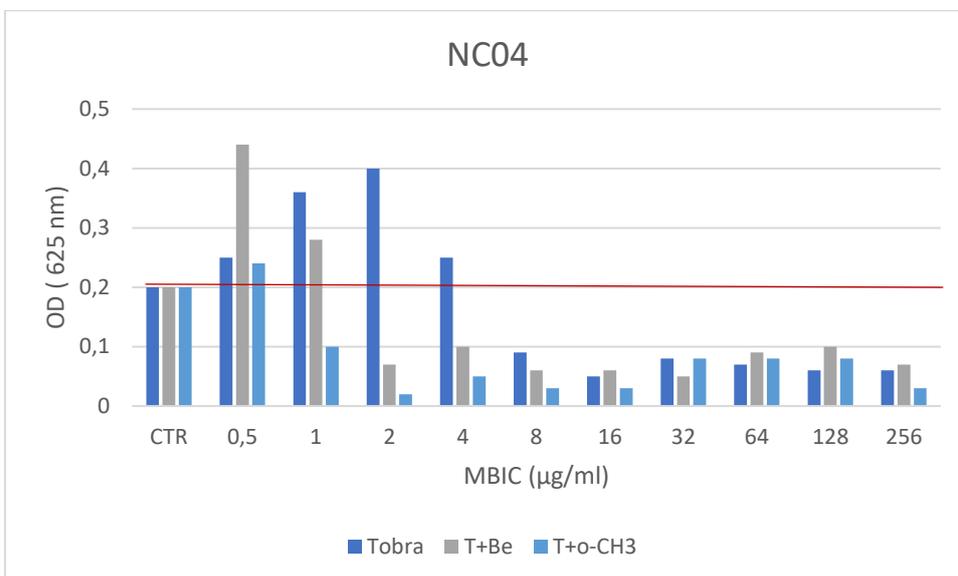
Nel ceppo C31 la MBIC era 128 µg/ml e si abbassava di 4 volte solo con l'utilizzo dell'EPI o-CH₃-Ber.



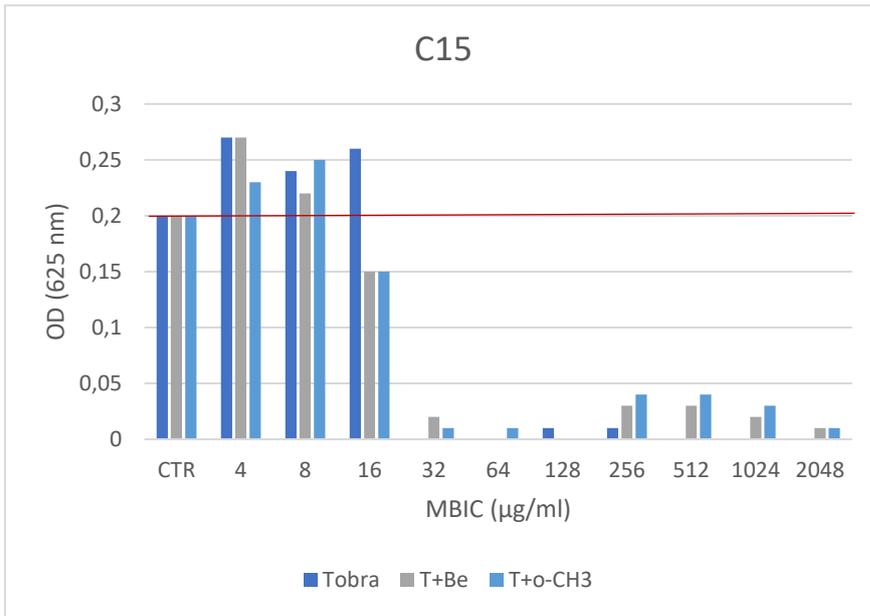
Nel ceppo C25 la MBIC era 16 µg/ml e si riduceva di 4 volte in presenza di entrambi gli EPI (Berberina e o-CH₃-Ber).



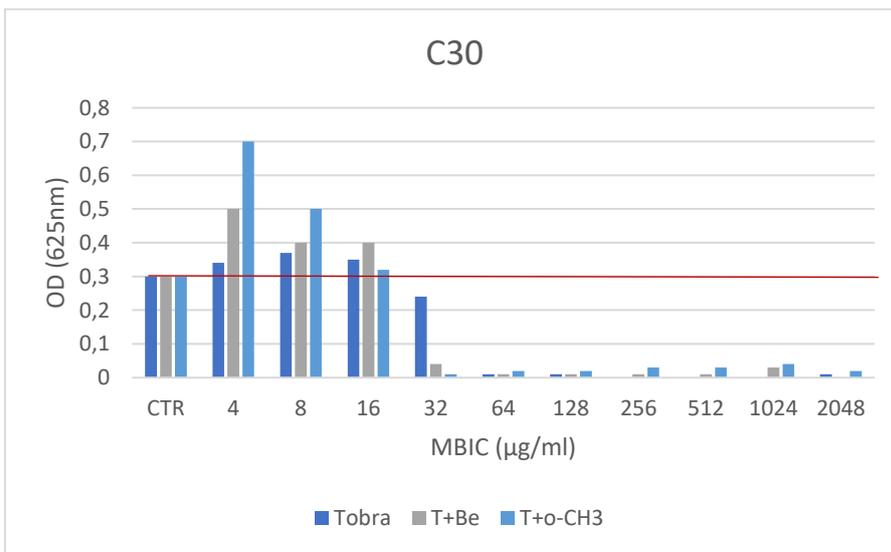
Nel ceppo AR48 la MBIC era 16 µg/ml e si dimezzava con l'utilizzo dell'o-CH₃-Ber.



Nel ceppo NC04 la MBIC era 4 µg/ml, e diminuiva di 4 volte con l'utilizzo dell'EPI o-CH₃-Ber.



Nel ceppo C15 la MBIC era 32 µg/ml e si dimezzava con l'uso degli EPI.



Nel ceppo C30 la MBIC era 32 µg/ml e rimaneva invariata anche in presenza dei due EPI.

Tutti i valori di MIC, MBIC e MBEC dei 10 ceppi di *P. aeruginosa* analizzati sono riportati per confronto nella tabella sottostante.

CEPPO	ANTIBIOTICO	MIC µg/ml	MBIC µg/ml	MBEC µg/ml
C6	Tobramicina	2-4	≤4	64
	T+Ber	0.5	≤4	64
	T+o-CH3-Ber	0.5	≤4	64
C15	Tobramicina	8-16	32	2048
	T+Ber	8	16	2048
	T+o-CH3-Ber	8	16	2048
C25	Tobramicina	16	16	512
	T+Ber	1	4	512
	T+o-CH3-Ber	1	4	256
C30	Tobramicina	16	32	>2048
	T+Ber	8	32	>2048
	T+o-CH3-Ber	8	32	>2048
C31	Tobramicina	8	128	>2048
	T+Ber	8	128	>2048
	T+o-CH3-Ber	8	32	>2048
C61	Tobramicina	64	256	2048
	T+Ber	16	256	2048
	T+o-CH3-Ber	8	64	2048
C104	Tobramicina	32	256	2048
	T+Ber	8	64	128
	T+o-CH3-Ber	8	32	128
AR48	Tobramicina	32	16	512
	T+Ber	8	16	32
	T+o-CH3-Ber	16	8	64
NCO4	Tobramicina	4-8	4	16
	T+Ber	0.5	2	4
	T+o-CH3-Ber	0.5	1	4
NCO6	Tobramicina	16	N.D.	16
	T+Ber	4	N.D.	8
	T+o-CH3-Ber	1	N.D.	4

Tabella 7. Tabella riassuntiva dei risultati di MIC, MBIC, MBEC

5.DISCUSSIONE

Gli antibiotici sono tra i farmaci di maggior successo mai sviluppati, tanto che a partire dalla seconda metà del XX secolo, hanno rivoluzionato l'approccio al trattamento e alla prevenzione delle malattie infettive permettendo l'evoluzione della medicina moderna. Dopo la loro scoperta e il largo uso in terapia umana, tuttavia, è subito apparso evidente che i batteri potevano sviluppare resistenza agli antibiotici vanificando in molti casi il loro utilizzo (Martinez *et al.*, 2014).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha dichiarato che l'antibiotico-resistenza in un'ampia gamma di agenti infettivi è diventata oggi un serio problema di salute pubblica. La causa principale dell'emergere e della diffusione della resistenza è l'eccessivo consumo di antibiotici sia nell'uomo che negli animali, dove questi farmaci vengono impiegati per favorire la crescita e nella profilassi. Anche la contaminazione ambientale, dovuta al rilascio di residui di antibiotici e batteri commensali che potrebbero contenere geni di resistenza, assume un ruolo importante per l'evoluzione futura di meccanismi di antibiotico-resistenza nei patogeni (Akova *et al.*, 2016, Martinez *et al.*, 2014).

La resistenza agli antibiotici può essere intrinseca o essere acquisita mediante mutazioni cromosomiche o in seguito a fenomeni di trasferimento genico orizzontale (HGT) (Davies *et al.*, 2010).

Nel febbraio 2017, per focalizzare e guidare la ricerca e lo sviluppo di nuovi antibiotici, l'OMS ha pubblicato un elenco di agenti patogeni per i quali è urgente un nuovo sviluppo antimicrobico. All'interno di questo ampio elenco, i patogeni ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) sono stati inseriti nella categoria di quei microrganismi contro i quali la necessità di nuovi farmaci è estremamente urgente (De Oliveira *et al.*, 2020).

I patogeni ESKAPE sono la principale causa di infezioni nosocomiali nel mondo (Santajit *et al.*, 2016) e sono spesso tra le più difficili da trattare, a causa del continuo aumento di ceppi multiresistenti.

La terapia antimicrobica generale per trattare efficacemente le infezioni prevede l'uso di antibiotici singoli o in combinazione. Ogni anno che passa, il numero complessivo di antibiotici efficaci contro i patogeni ESKAPE sta diminuendo, il che ci sta predisponendo verso un futuro con antibiotici ormai inutilizzabili. È, quindi, fondamentale sviluppare anche strategie alternative per

trattare le infezioni, in particolare quelle causate dai patogeni ESKAPE (Mansura *et al.*, 2019).

Tra questi patogeni, *Pseudomonas aeruginosa* ha una rilevanza importante in quanto è un patogeno opportunisto che rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti con fibrosi cistica e negli individui immunocompromessi. L'eradicazione di *P. aeruginosa* è diventata sempre più difficile a causa della sua notevole capacità di resistere agli antibiotici. Infatti *P. aeruginosa* è resistente ad un'ampia varietà di antibiotici, compresi aminoglicosidi, chinoloni e β -lattamici grazie a meccanismi di resistenza sia intrinseca che acquisita (Zheng *et al.*, 2021; Pang *et al.*, 2019).

Uno dei meccanismi di resistenza intrinseca in questi batteri è l'espressione di pompe di efflusso in grado di espellere dalla cellula una varietà di sostanze e antibiotici (Ivanov *et al.*, 2022).

In particolare, la pompa di efflusso MexX-MexY-OprM svolge un ruolo importante nella resistenza batterica agli antibiotici aminoglicosidici in *P. aeruginosa* (Zheng Fan *et al.*, 2021). Inoltre, tra i meccanismi di resistenza di *P. aeruginosa* non è da sottovalutare la capacità dei ceppi di produrre biofilm, spesso associata alle infezioni polmonari nei pazienti con fibrosi cistica (Pang *et al.*, 2019). Il biofilm formando una barriera che impedisce la diffusione degli

antibiotici, limiterebbe il loro accesso alle cellule batteriche. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che in *P. aeruginosa* le pompe di efflusso possono essere correlate anche alla produzione di biofilm, probabilmente perché coinvolte nel trasporto delle molecole del *quorum sensing* che regola la formazione di biofilm (Alav *et al.*, 2018).

Pertanto, la ricerca di composti che agiscono come inibitori delle pompe di efflusso è una strategia promettente per aggirare nel batterio questo meccanismo di resistenza (Giorgini *et al.*, 2021) e andare ad interferire anche con la sua capacità di formare biofilm.

Lo scopo di questa tesi è stato, quindi, quello di testare composti chimici sintetizzati dal Dipartimento di Chimica dell'Università Politecnica delle Marche da utilizzare come potenziali inibitori della pompa di efflusso MexXY-OprM in ceppi clinici di *P. aeruginosa* resistenti agli aminoglicosidi.

I tre composti utilizzati sono stati sintetizzati come derivati della Berberina, composto che era già stato testato come EPI e che in combinazione con la tobramicina aveva dimostrato la sua efficacia.

Inizialmente i 10 ceppi di *P. aeruginosa* presi in esame (C6, C15, C25, C30, C31, C61, C104, AR48, NC04, NC06) sono stati valutati per determinare la MIC (la concentrazione minima inibente) di tobramicina e stabilire il loro

livello di resistenza. Sei ceppi erano resistenti con valori di MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, due mostravano un livello di resistenza intermedio (MIC=8 $\mu\text{g/ml}$) e due erano sensibili (MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$).

Quindi è stata valutata la MIC dell'associazione tobramicina/composti utilizzando una concentrazione fissa di EPI (80 $\mu\text{g/ml}$ per la Berberina e 40 $\mu\text{g/ml}$ per l'o-CH₃-Ber) in combinazione con concentrazioni scalari di tobramicina. La tobramicina in associazione con i composti ha provocato una riduzione della MIC in tutti i ceppi testati tranne che nei ceppi C15 e C31 in cui la MIC di tobramicina è rimasta invariata. Sia la Berberina che l'o-CH₃-Ber aggiunti al terreno a concentrazioni fisse erano dunque in grado di aumentare la sensibilità dei ceppi alla tobramicina.

A questo punto per valutare la sinergia tra i composti e la tobramicina nei confronti dei ceppi di *P. aeruginosa*, e determinare le concentrazioni più efficaci, sono stati eseguiti i test a scacchiera (checkerboard) in cui i composti EPI e la tobramicina sono stati testati in combinazione a concentrazioni scalari.

La più bassa concentrazione del composto EPI che in combinazione con l'antibiotico era in grado di ridurre il valore di MIC della tobramicina di 4 volte veniva considerata quella efficace, in grado di inibire la pompa di efflusso e di produrre un effetto sinergico con l'antibiotico.

I composti risultati più attivi erano l'o-CH₃-Ber e il p-BZ-Ber con un'attività tra loro paragonabile. Per quanto riguarda il composto p-NO₂-Ber, invece, per avere un abbassamento della MIC di 4 volte, nella maggior parte dei ceppi, era necessaria una concentrazione di EPI maggiore rispetto a quella degli altri due composti, e in alcuni ceppi non si raggiungeva mai un abbassamento significativo della MIC. L'unico ceppo in cui tutti e tre i composti non riuscivano a modificare per niente o di appena una diluizione la MIC della tobramicina, era il ceppo C15. Questo ceppo come gli altri, non presentava altri meccanismi di resistenza agli aminoglicosidi, quindi la mancata efficacia degli EPI, in questo ceppo, potrebbe essere correlata al polimorfismo nella sequenza di MexY che determina una minore affinità di legame dell'EPI nei confronti di MexY.

Dal checkerboard è emerso inoltre che i composti o-CH₃-Ber e il p-BZ-Ber ripristinavano il fenotipo sensibile o intermedio già a concentrazione di composto pari a 10 µg/ml o 20 µg/ml nella maggior parte dei casi.

Anche in ceppi già sensibili alla tobramicina come C6, in presenza di 10 µg/ml di EPI (o-CH₃-Ber e di p-BZ-Ber) si osservava un abbassamento della MIC della tobramicina di 4 volte, dimostrando un'interazione sinergica degli EPI con la tobramicina.

I composti o-CH₃-Ber e il p-BZ-Ber potrebbero essere potenziali molecole candidate come inibitori delle pompe di efflusso da utilizzare in terapia, se le concentrazioni efficaci risultassero non tossiche per l'organismo umano.

In seguito, è stato eseguito il test di produzione di biofilm nei 10 ceppi di *P. aeruginosa* mediante il test del cristalvioletto per vedere quali ceppi fossero produttori di biofilm e se l'esposizione a tobramicina/EPI potesse influenzare la formazione di biofilm o essere più efficace dell'antibiotico da solo nella sua eradicazione. Dagli esperimenti è emerso che tutti e 10 i ceppi erano produttori di biofilm: i ceppi C6, C15, C30, C31, C104, NC04, AR48, K767 risultavano mediamente produttori e i ceppi C25, C61 e NC06 deboli produttori.

La capacità dei microorganismi di resistere a diversi fattori e di colonizzare l'ambiente aumenta nel biofilm. I biofilm, infatti sono comunità batteriche sessili adese ad un substrato ed immerse in una matrice esopolisaccaridica prodotta dalle cellule stesse. All'interno di questa matrice le cellule esibiscono fenotipo, metabolismo, fisiologia ed espressione genica diversi rispetto alla controparte planctonica. I batteri che formano il biofilm possono essere fino a 1000 volte più resistenti agli agenti antimicrobici rispetto a quelli nello stato planctonico (Galdiero *et al.*, 2019). Per queste ragioni le concentrazioni di antibiotico necessarie ad inibire e ad eradicare la struttura del biofilm sono maggiori rispetto alle concentrazioni utilizzate per inibire la crescita batterica.

Questo è stato riscontrato nei test per la determinazione della MBIC e dell'MBEC in cui si è osservato che le concentrazioni necessarie per inibire la formazione di biofilm e per eradicarlo erano più elevate rispetto a quelle utilizzate per inibire la crescita batterica.

In particolare, per quanto riguarda le MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration), nella maggior parte dei ceppi la stessa concentrazione di tobramicina era necessaria per inibire la crescita batterica sia in forma planctonica che in biofilm, cioè MIC e MBIC erano uguali. In alcuni ceppi tuttavia la MBIC era da 4 a 16 volte più alta della MIC. In presenza di Berberina o di o-CH₃-Ber la MBIC di tobramicina per quasi tutti i ceppi non variava o si dimezzava.

Per quanto riguarda l'MBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentration), nei ceppi C104, AR48, NC04, NC06 c'è stata una riduzione del valore di MBEC della tobramicina fino a 16 volte con l'utilizzo della combinazione tobramicina/berberina o tobramicina/o-CH₃-Ber rispetto all'utilizzo della tobramicina da sola. Questo suggeriva che per l'eradicazione del biofilm di questi ceppi l'utilizzo degli EPI in combinazione con l'antibiotico porta a risultati migliori rispetto all'utilizzo della sola tobramicina. Nei ceppi C104, AR48, NC06 quindi, nonostante la resistenza alla tobramicina, l'inibizione della pompa di efflusso MexXY da parte degli EPI, permetteva alla tobramicina

sia di inibire la crescita batterica che di eradicare il biofilm a concentrazioni molto più basse.

In diversi ceppi, invece, (C6, C15, C30, C31, C61) non è stata notata differenza tra l'utilizzo della sola tobramicina e della tobramicina in combinazione con la berberina o con il composto o-CH₃-Ber nella capacità di eradicare il biofilm, suggerendo che in questi ceppi anche se gli EPI inibiscono l'attività della pompa di efflusso e fanno aumentare la sensibilità dei ceppi all'antibiotico, questi non sono in grado di migliorare l'attività del farmaco nella eradicazione del biofilm, dimostrato dai valori invariati dell'MBEC.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno suggerito che tra i tre composti derivati della Berberina utilizzati, i composti che hanno mostrato una migliore efficacia nella riduzione della MIC della tobramicina sono l'o-CH₃-Ber e p-BZ-Ber. Dai saggi eseguiti il composto o-CH₃-Ber è risultato il più efficace, in grado di agire sinergicamente alla tobramicina per inibire la crescita batterica, in alcuni casi anche quando le cellule si trovano in biofilm. La variabilità nella risposta agli EPI da parte dei diversi ceppi merita approfondimenti, perché potrebbe essere correlata al polimorfismo della proteina MexY che riduce l'affinità di legame del composto. Mediante modifiche nella struttura chimica degli EPI si potrebbero quindi ottenere composti ancora più efficaci,

potenzialmente capaci di agire in sinergia con gli antibiotici per contrastare la crescita di ceppi resistenti e produttori di biofilm.

BIBLIOGRAFIA

1. Potron A, Poirel L, Nordmann P. *Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: Mechanisms and epidemiology. Int J Antimicrob Agents.* (2015) Jun;45(6):568-85.
2. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolffs PF. *Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Front Microbiol.* (2016) Feb 19; 7:173.
3. Munita JM, Arias CA. *Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr.* (2016)
4. Kumar S, Lekshmi M, Parvathi A, Ojha M, Wenzel N, Varela MF. *Functional and Structural Roles of the Major Facilitator Superfamily Bacterial Multidrug Efflux Pumps. Microorganisms.* (2020) Feb 16;8(2):266.
5. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R. *Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. Lancet Infect Dis.* (2014) Aug;14(8):742-750.

6. Van Boeckel T. P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., Robinson T. P., et al. (2015). *Global trends in antimicrobial use in food animals*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 5649–5654. 10.1073/pnas.1503141112
7. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB. *A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment*. Chemosphere. (2006) Oct;65(5):725-59.
8. Cox G, Wright GD. *Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions*. Int J Med Microbiol. (2013) Aug;303(6-7):287-92.
9. Huddleston JR. *Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes*. Infect Drug Resist. (2014) Jun 20; 7:167-76.
10. Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. *Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources*. J Antimicrob Chemother. (2007) Jun;59(6):1247-60.
11. Piddock LJ. *Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria*. Clin Microbiol Rev. (2006) Apr;19(2):382-402.
12. Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). *The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 51(1), 9-11

13. Sun J, Deng Z, Yan A. *Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations*. *Biochem Biophys Res Commun*. (2014) Oct 17;453(2):254-67.
14. Sobel ML, McKay GA, Poole K. *Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. *Antimicrob Agents Chemother*. (2003) Oct;47(10):3202-7.
15. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plésiat P. *MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides*. *Antimicrob Agents Chemother*. (2003) Apr;47(4):1371-5.
16. Giorgini G, Mangiaterra G, Cedraro N, Laudadio E, Sabbatini G, Cantarini M, Minelli C, Mobbili G, Frangipani E, Biavasco F, Galeazzi R. *Berberine Derivatives as Pseudomonas aeruginosa MexXY-OprM Inhibitors: Activity and In Silico Insights*. *Molecules*. (2021) Nov 2;26(21):6644.
17. Li XZ, Nikaido H. *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*. *Drugs*. (2004);64(2):159-204.
18. Cannalire R, Mangiaterra G, Felicetti T, Astolfi A, Cedraro N, Massari S, Manfroni G, Tabarrini O, Vaiasicca S, Barreca ML, Cecchetti V, Biavasco F, Sabatini S. *Structural Modifications of the Quinolin-4-yloxy Core to Obtain*

- New Staphylococcus aureus NorA Inhibitors*. Int J Mol Sci. (2020) Sep 24;21(19):7037.
19. Laudadio E., Cedraro N., Mangiaterra G., Citterio B., Mobbili G., Minelli C., Bizzaro D., Biavasco F., Galeazzi R. *Natural Alkaloid Berberine Activity against Pseudomonas aeruginosa MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance: Studi in silico e in vitro*. J. Nat. prod. (2019); 82 :1935–1944.
20. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies*. Biotechnol Adv. (2019) Jan-Feb;37(1):177-192.
21. Rada B. *Interactions between Neutrophils and Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis*. Pathogens. (2017) Mar 9;6(1):10.
22. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses*. Pathog Dis. (2013) Apr;67(3):159-73.
23. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance*. Trends Microbiol. (2011) Aug;19(8):419-26.
24. Lambert PA. *Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med. (2002);95 Suppl 41(Suppl 41):22-6.
25. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. *Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation*. J Antimicrob Chemother. (2018) Aug 1;73(8):2003-2020.

26. Sánchez P, Linares JF, Ruiz-Díez B, Campanario E, Navas A, Baquero F, Martínez JL. *Fitness of in vitro selected Pseudomonas aeruginosa nalB and nfxB multidrug resistant mutants.* J Antimicrob Chemother. (2002) Nov;50(5):657-64.
27. Favre-Bonté S, Köhler T, Van Delden C. *Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin.* J Antimicrob Chemother. (2003) Oct;52(4):598-604.
28. Waite RD, Papakonstantinou A, Littler E et al. *Transcriptome analysis of Pseudomonas aeruginosa growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms.* J Bacteriol (2005); 187: 6571–6.
29. Zhang L, Mah TF. *Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics.* J Bacteriol. (2008) Jul;190(13):4447-52.
30. Kvist M, Hancock V, Klemm P. *Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation.* Appl Environ Microbiol. (2008) Dec;74(23):7376-82.
31. Baugh S, Phillips CR, Ekanayaka AS, Piddock LJ, Webber MA. *Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation.* J Antimicrob Chemother. (2014) Mar;69(3):673-81.

32. Soto SM. *Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in biofilm*. *Virulence*. (2013) Apr 1;4(3):223-9.
33. Martinez JL. *General principles of antibiotic resistance in bacteria*. *Drug Discov Today Technol*. (2014) Mar; 11:33-9.
34. Akova M. *Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections*. *Virulence*. (2016) Apr 2;7(3):252-66.
35. Julian Davies and Dorothy Davies *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance* (2010) Sep; 74(3): 417–433
36. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. *Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. *Clin Microbiol Rev*. (2020) May 13;33(3): e00181-19.
37. Santajit S, Indrawattana N. *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. *Biomed Res Int*. (2016); 2016:2475067.
38. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. *Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review*. *Front Microbiol*. (2019) Apr 1; 10:539.
39. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies*. *Biotechnol Adv*. (2019) Jan-Feb;37(1):177-192.

40. Ivanov ME, Fursova NK, Potapov VD. *Pseudomonas aeruginosa efflux pump superfamily* (review of literature). *Klin Lab Diagn.* (2022) Jan 21;67(1):53-58.
41. Zheng Fan , Xiaolei Pan , Dan Wang , Ronghao Chen , Tongtong Fu , Baopeng Yang , Yongxin Jin , Fang Bai ,^{un} Zhihui Cheng , e WeihuiWu. *Pseudomonas aeruginosa Polynucleotide Phosphorylase Controls Tolerance to Aminoglycoside Antibiotics by Regulating the MexXY Multidrug Efflux Pump.* (2021)
42. Galdiero E, Siciliano A, Gesuele R, Di Onofrio V, Falanga A, Maione A, Liguori R, Libralato G, Guida M. *Melittin Inhibition and Eradication Activity for Resistant Polymicrobial Biofilm Isolated from a Dairy Industry after Disinfection.* *Int J Microbiol.* (2019) Jan 15; 2019:4012394.

