

# BACHELOROPPGAVE

	PROSJEKT NR. 13
	TILGJENGELIGHET Åpen
BACHELOROPPGAVENS TITTEL  Nye forbindelser i bekjempelsen mot antibiotikaresistent tuberkulose	DATO 25.05.2022
	ANTALL SIDER / BILAG 62/1
FORFATTERE  Shivani Kubendraraj og Sharuga Sanjeevan	INTERN VEILEDER Tone Berge

UTFØRT I SAMMARBEID MED  Enhet for Genomdynamikk, avdeling for mikrobiologi ved Universitetet i Oslo og Oslo universitetssykehus	EKSTERNE VEILEDERE Tone Tønjum, Tahira Riaz, Mari Støen, Siva Krishna Vagolu
--	---

<b>SAMMENDRAG</b> <p>I dette prosjektet ble fire gramnegative bakterier (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Acinetobacter baumannii</i>, <i>Enterobacter cloacae</i> og <i>Klebsiella pneumoniae</i>), en laboriestedamme av <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB), og to INH-resistente MTB stammer testet med 17 forbindelser og kontrollforbindelsen Ciprofloxacin. Dette ble gjort for å teste og finne nye forbindelser som hemmer MTB og de ulike gramnegative bakteriene. Diskdiffusjon og Microbroth Dilution ble benyttet for screening av de ulike gramnegative bakteriene med testforbindelser. MABA assay ble brukt til screening av H37Rv, MTB #1 med <i>KatG</i> mutert stamme, og MTB #7 med <i>InhA</i> mutert stamme. Samlet sett er kontrollstammen Ciprofloxacin den beste forbindelsen til eliminering av INH-resistent MTB. Av testforbindelsene ga forbindelse 3, 4, 5, 11, 15 og 16 tilstrekkelig hemming av bakterievekst ved at forbindelsene hadde en <math>IC_{50}</math> verdi lavere enn 50 <math>\mu</math>M. Av de nye testforbindelsene virket forbindelse 11 best mot laboriestedammen, forbindelse 5 regnes som best mot MTB #1, og forbindelsene 3 og 5 virker best mot #7. Toksisiteten av forbindelsene mot HEK-293 celler ble målt ved bruk av MTT Assay. Betydelige feilkilder og mangel på replikater gjorde at gyldige konklusjoner om toksisiteten av forbindelser ikke kunne trekkes.</p>
--

3 STIKKORD <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Antibiotika-resistens
Ny antibiotika

## Innholdsfortegnelse:

<i>Forord</i> .....	<i>IV</i>
<i>Sammendrag</i> .....	<i>1</i>
<i>Liste over forkortelser og symboler</i> .....	<i>3</i>
<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Bakterier</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2. ESKAPE patogener</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	8
1.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	9
1.2.3. <i>Enterobacter cloacae</i> .....	9
1.2.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
<b>1.3. Mykobakterier</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	11
1.3.2. MTB stammer.....	11
<b>1.4. Tuberkulose i Norge og verden</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5. Diagnostikk av tuberkulose</b> .....	<b>14</b>
1.5.1. Symptomer.....	14
1.5.2. Detektering .....	15
1.5.3. Behandling.....	16
1.5.4. Isoniazid og Rifampicin.....	17
1.5.5. Pyrazinamid, Ethambutanol og Streptomycin .....	17
1.5.6. Andre-generasjonsmedikamenter mot multiresistent TB .....	18
<b>1.6. Testforbindelser</b> .....	<b>19</b>
<b>1.7. Bakgrunn for prosjektet</b> .....	<b>20</b>
<b>2. Materialer og metoder</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1. Innslutningsnivå 2 og 3</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2. Sterilisering av utstyr og næringsmedier</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3. Tillaging av vekstmedium</b> .....	<b>24</b>
2.3.1. Mueller Hinton medium .....	24
2.3.2. 7H9 Medium .....	25
2.3.3. 7H10 Agar .....	25
2.3.4. DMEM medium.....	26

<b>2.4. Bakteriedyrking</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5. Diskdiffusjon</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6. MicroBroth Dilution</b> .....	<b>30</b>
2.6.1. MicroBroth Dilution med gramnegative bakterier .....	31
2.6.2. MABA assay med <i>M. tuberculosis</i> .....	32
<b>2.7. MTT Assay</b> .....	<b>34</b>
2.7.1. Splitting og behandling av HEK-293 celler med testforbindelser.....	35
2.7.2. Tilsettelse av MTT fargereagens .....	36
2.7.3. Frysing av HEK-293 celler for oppbevaring .....	36
<b>2.8. Behandling av rådata</b> .....	<b>37</b>
<b>3. Resultater</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1. Generell screening med gramnegative bakterier</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2. Effekt av testforbindelser mot gramnegative bakterier</b> .....	<b>39</b>
<b>3.3. Effekt av testforbindelser mot MTB</b> .....	<b>41</b>
<b>3.4. Toksisitet av testforbindelser mot humane celler</b> .....	<b>43</b>
<b>4. Diskusjon</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1. Diskdiffusjon med gramnegative bakterier</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2. Ciprofloxacin-resistens hos <i>E. cloacae</i></b> .....	<b>47</b>
<b>4.3. Effekten av inkubasjonstid i MABA Assay</b> .....	<b>48</b>
<b>4.4. Interferens mellom fargestoff og testforbindelser</b> .....	<b>49</b>
<b>4.5. Usikkerhet knyttet til MTT assay</b> .....	<b>50</b>
<b>5. Konklusjon</b> .....	<b>52</b>
<b>6. Referanseliste</b> .....	<b>54</b>
<b>7. Vedlegg</b> .....	<b>60</b>
<b>7.1. Vedlegg 1 – Materialer</b> .....	<b>60</b>
7.1.1. Utstyrliste .....	60
7.1.2. Kjemikalier/løsninger .....	61
7.1.3. Cellelinje og bakterier.....	62
7.1.4. Programmer .....	62

## Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet som en avsluttende oppgave ved studiet Bioteknologi og kjemiingeniør ved institutt for maskin, elektronikk og kjemi, fakultet for teknologi, kunst og design ved OsloMet – storbyuniversitetet. Prosjektet er utført ved Enhet for Genomdynamikk, avdeling for mikrobiologi ved Universitetet i Oslo og Oslo universitetssykehus. Det praktiske prosjektarbeidet ble utført i perioden januar 2022 – april 2022.

Vi ønsker først og fremst å helhjertet takke våre eksterne veiledere Professor Tone Tønjum, Mari Støen, Dr. Tahira Riaz og Siva Krishna Vagolu for deres veiledning og oppfølging ved det teoretiske og praktiske arbeidet. Tusen takk for gode innspill, smittomt engasjement og hyggelige samtaler. Vi vil gjerne takk alle ved Enhet for Genomdynamikk for et inspirerende og inkluderende arbeidsmiljø.

Vi ønsker i tillegg å takke vår interne veileder Professor Tone Berge for veiledning, støtte og tilgjengelighet under utførelsen av prosjektet.

Fakultet for teknologi, kunst og design  
Institutt for maskin, elektronikk og kjemi  
OsloMet – storbyuniversitetet

Oslo, 20.05.2022



Sharuga Sanjeevan



Shivani Kubendraraj

## Sammendrag

Tuberkulose er en av de dødeligste infeksjonssykdommene globalt sett og forårsakes av bakterien *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Bakteriene kan utvikle resistens mot medisiner, og dette fører til krevende behandling av sykdommer. Det er dermed nødvendig med oppdagelse av nye antibiotika forbindelser og medikamenter. Hensikten med dette prosjektet er å teste og finne nye forbindelser som hemmer antibiotikaresistent MTB. De nye forbindelsene vil bli testet mot resistente kliniske MTB isolater. Forbindelsene som undersøkes i dette prosjektet er andre-generasjons testforbindelser. Prosjektet er delt i tre deler hvor første del omfatter studier av de gramnegative bakteriene *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* og *Klebsiella pneumoniae*. Andre del omfatter undersøkelser av ulike MTB stammer, mens siste del omfatter arbeid med Human Embryonic Kidney (HEK) 293 celler for å teste toksisiteten til testforbindelsene.

I arbeid med dette prosjektet ble diskdiffusjon brukt for å screene 17 testforbindelser og kontrollforbindelsen Ciprofloxacin mot de ulike gramnegative bakteriene, og MicroBroth Dilution ble benyttet for å screene testforbindelser mot både gramnegative bakterier og ulike MTB stammer. MABA (Microplate Alamar Blue Assay) ble brukt for å måle hvilke testforbindelser som hemmer vekst av ulike MTB stammer. Toksisitetsmåling av testforbindelsene mot HEK-293 celler ble utført ved bruk av MTT assay.

Resultater for diskdiffusjon av gramnegative bakterier viste hemming av *P. aeruginosa* med forbindelse 9, og Ciprofloxacin for både *P. aeruginosa* og *A. baumannii*. Disse forbindelsene ble selektert videre for utførelse av Microbroth Dilution. Ved denne metoden ble det i tillegg observert hemming av *A. baumannii* med forbindelse 9, og dette indikerer på at en generell screening med disk diffusjon ikke har fanget opp alle aktive forbindelser mot de gramnegative bakteriene. MicroBroth Dilution ble utført mot alle fire bakteriene med alle forbindelser, inkludert Ciprofloxacin. Det ble observert hemming av bakteriene med fem flere testforbindelser enn det som ble oppnådd ved diskdiffusjon. Microbroth Dilution ble dermed brukt som en kontroll for å fange opp andre aktive forbindelser mot bakteriene som ellers ikke ble fanget opp med diskdiffusjon. Det kan være ulike feilkilder knyttet til

diskdiffusjon som blant annet løseligheten av forbindelsene, feilpreparering av diskene, og metode for påstrykning av bakterier på agarplater.

Alle 17 testforbindelser og Ciprofloxacin ble screenet mot laboriostammen H37Rv ved bruk av MABA assay. Resultatet av denne screeningen viste at kontrollforbindelsen og forbindelsene 3, 4, 5, 11, 15 og 16 ga best hemming av H37Rv. Disse forbindelsene ble valgt ut til screening mot isoniazid-resistent MTB #1 med *katG* mutasjon og MTB #7 med *InhA* mutasjon. Ved screening av de selekterte forbindelsene med #1 og #7 ble det observert interferens mellom fargereagenset Resazurin og testforbindelsene, men interferensen førte ikke til komplikasjoner ved bestemmelse av IC<sub>50</sub> verdier. Derimot resulterte screeningen med #1 og #7 i uidentifiserbare resultater på grunn av inkubasjonstid. For å oppnå tydeligere resultater ble screeningen foretatt med 14 dager inkubasjon i stedet for syv dager. Dette førte til tolkbare resultater. Av testforbindelsene hadde forbindelse 11 best hemming av H37Rv med en IC<sub>50</sub> verdi på 1,576 µM. Forbindelse 5 med en IC<sub>50</sub> verdi på 3,197 µM ga best hemming av stammen med *KatG* mutasjon. Stammen med *InhA* mutasjon ble best hemmet av forbindelse 3 og 5 hvor IC<sub>50</sub> verdien var på 1,326 µM.

Hemming av humane celler med testforbindelsene ble målt med inhibitor concentration (IC<sub>50</sub>). Analysene fra MTT assay viste at IC<sub>50</sub> verdien for forbindelse 4 er over 100 µM. Dette indikerer til at der høy konsentrasjon av celler i testbrønnen. Med dette i betraktning ble forbindelse 4 tolket som den tryggeste av testforbindelsene mot HEK-293 celler. Tap av moderate mengder av formazan-krystaller ble observert ved fjerning av fargereagens fra brønnene. Observasjonen fører til stor usikkerhet i kalkulering av IC<sub>50</sub> verdier for toksisitet bestemmelse av de ulike testforbindelsene. Feilkildene i forsøket fører til at det kreves videre testing av forbindelsene for å trekke gyldige konklusjoner om toksisitet ved testforbindelsene med HEK-293 celler.

Med resultatene i betraktning kan det konkluderes at hensikten med prosjektet er oppnådd. For H37Rv, #1 og #7 virket henholdsvis forbindelse 11, forbindelse 5, og forbindelsene 3 og 5 best. Men totalt sett var det kontrollstammen Ciprofloxacin som var den beste forbindelsen til eliminering av INH-resistent MTB. For høyere sensitive resultater bør likevel forsøket repeteres etter bestemmelsen av interaksjonseffekten av Resazurin og testforbindelser.

## Liste over forkortelser og symboler

BSL	BioSafety Level
CFU	Colony forming unit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
EMB	Ethambutanol
FBS	Fetal Bovine Serum
HEK	Human Embryonic Kidney celler
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration at 50% inhibition
IGRA	Interferon- Gamma Release Assay
INH	Isoniazid
MABA	Microplate Alamar Blue Assay
MDR-TB	Multiresistent tuberkulose
M.H. Medium	Mueller Hinton Medium
MIC	Minimum inhibition concentration
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromid Assay
OADC	Oleic Albumin Dextrose Catalase
OD	Optical Density
PS	Penicillin Streptomycin
PZA	Pyrazinamid
RIF	Rifampicin
SM	Streptomycin
TB	Tuberkulose
WHO	World Health Organization
XDR-TB	Extensively Drug-Resistant Tuberculosis

# 1. Introduksjon

## 1.1. Bakterier

Mikroorganismer, også kalt mikrober, er levende organismer som ikke kan observeres med det blotte øyet. Observasjon av mikroorganismer, som bakterier, virus, parasitter og sopp, foretas ved bruk av mikroskop. Enkelte mikroorganismer, som bakterier, er encellede organismer som kalles prokaryoter. I motsetning til eukaryoter har ikke prokaryoter cellekjerne eller andre membranbundne organeller. De fleste bakterier har en av to former for cellevegg. Grampositive bakterier har cellevegg som består av et tykt lag av peptidoglykan utenpå plasmamembranen. Peptidoglykan er lineære polysakkaridkjeder som består av N – acetylmuraminsyre og N – acetylglucosamine, og er bundet sammen av peptider. Gramnegative bakterier har cellevegg bestående av både en ytre lipidmembran og et tynt lag av peptidoglykan utenpå plasmamembranen (Ambur, 2021).

Enkelte bakterier er en naturlig del av kroppens normalflora, og finnes blant annet på huden og i tarmen (Tønjum, 2009). Slike bakterier er stort sett uskadelig for mennesker og er en essensiell del av ulike mekanismer og systemer i immunforsvaret og andre deler av kroppen. Mikrobiom, som er en fellesbetegnelse for mikrober i blant annet menneskekroppens normalflora, bidrar til blant annet syntetisering av vitaminer, nedbrytning av cellulose, absorpsjon av mineraler, destruksjon av toksiner og mutagener, og er blant annet essensielle for aktivering av ulike forbindelser for utførelsen av bioaktiviteter (Aarnes, 2018) og (Zhang et al., 2015). Et eksempel på en slik forbindelse er lignan, som aktiveres av bakterier, og bidrar til beskyttelse mot blant annet kardiovaskulære sykdommer, osteoporose og bryst, tarm- og prostatakreft (Zhang et al., 2015). Bakterier i normalfloraen fører ikke til endogen infeksjon eller sykdom når verten ikke har et nedsatt immunforsvar eller så lenge bakteriene ikke sprer seg til sterile bakteriefrie områder i kroppen. Andre bakterier kategoriseres som patogener, som vil si at bakteriene har sykdomsfremkallende egenskaper i en vert (Rollag et al., 2019). Infeksjoner som forårsakes av patogener kalles for eksogene infeksjoner. *Mycobacterium tuberculosis* er en bakterie som fører til sykdommen kjent som tuberkulose.

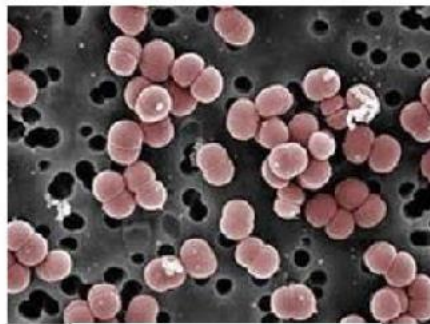
Sykdommer kan altså forekomme av bakterier. Eksempler på slike sykdommer er tuberkulose, lungebetennelse, endokarditt, hjernehinnebetennelse, osteomyelitt,



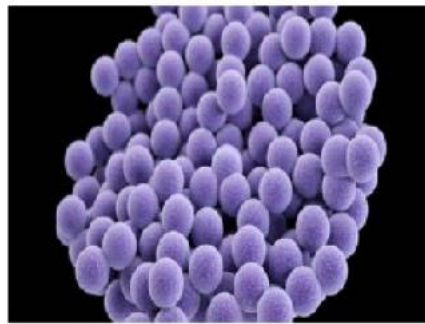
urinveisinfeksjon og akutt lungesviktsyndrom (ARDS) (Bodey et al., 1983) og (Ramirez & Giron, u.å.). Det finnes flere behandlinger og forebyggende tiltak for ulike bakterielle sykdommer, men i de siste årene har en økende trend av antibiotikaresistens i bakterier blitt en trussel mot global helse og miljø. Antibiotikaresistens forekommer når bakterier og andre mikroorganismer har resistens mot antibiotika. Det betyr at sykdomsfremkallende bakterier, i eksempelvis mennesker, ikke drepes av enkelte antibiotika. I tilfeller med antibiotikaresistens økes bruken av andre -og tredjegenarasjon antibiotika. Slike medisiner kan føre til mindre effektive, vanskeligere og lengere behandling, i tillegg til at medikamentene i noen tilfeller kan føre til alvorlige bivirkninger, deriblant organsvikt (CDC, u.å.-a). Dette er noen av grunnene til at det er en synkende trend i behandlingseffektivitet og en økende trend i vanskeligheten av behandling av sykdommer som tuberkulose, salmonellose og lungebetennelse. Antibiotikaresistens er i tillegg en av årsakene til at det er en økende trend i varigheten av sykdomsforløpet og dødeligheten blant pasienter med bakterielle infeksjoner. Oppdagelsen av nye medikamenter, regulering av antibiotikabruk, vaksinasjon og hygienetiltak er meget viktig for bekjempelse av sykdom og spredning av antibiotikaresistente bakterier (WHO, 2020).

## 1.2. ESKAPE patogener

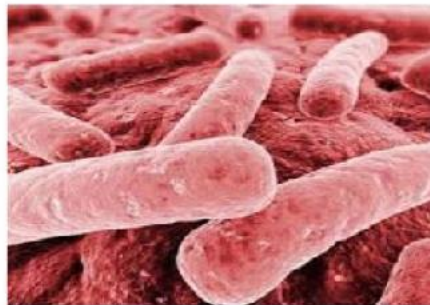
ESKAPE patogener er et begrep som brukes om seks sterkt virulente og antibiotikaresistente bakterielle patogener. Figur 1 viser at *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Enterobacter* tilhører gruppen. Slike patogener unnslipper de mest vanlig brukte antibiotika medikamentene på grunn av bakterienes økende tendens til resistens. Dette fører til at det er nødvendig å finne nye antibiotika forbindelser og medikamenter som kan behandle sykdommer som skyldes ESKAPE patogener (Mulani et al., 2019).



*Enterococcus faecium*



*Staphylococcus aureus*



*Klebsiella pneumoniae*



*Acinetobacter baumannii*



*Pseudomonas aeruginosa*



*Enterobacter*

Figur 1 viser ulike bakterier innenfor ESKAPE patogener (Rahim et al., 2018).

World Health Organization (WHO) har publisert en liste over bakterier som det er akutt behov for nye antibiotika mot. Dette er fordi disse bakteriene utgjør en stor trussel mot menneskets helse. I listen fremheves spesielt trusselen av gramnegative bakterier som er resistente mot flere antibiotika forbindelser. Disse bakteriene har innebygde evner til å finne nye måter for å motstå behandling. Bakterier kan overføre genetisk materiale ved horisontal genoverføring, som konjugasjon og transformasjon. Dette bidrar til overføring av antibiotikaresistens mellom bakterier. WHO har delt listen inn i tre kategorier: kritisk, høy og middels prioritet, med henhold til hvor stor hast det er for behovet for nye antibiotika forbindelser. Den mest kritiske gruppen inkluderer multiresistente bakterier som spesielt utgjør en trussel på sykehus, sykehjem, og blant pasienter som krever behandling med utstyr

som ventilatorer og blodkatetre. Inn under den kritiske gruppen finnes blant annet bakteriene *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* og *Enterobacter* (WHO, 2017).

De gramnegative bakteriene *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* og *Klebsiella pneumoniae* ble brukt som en del av teknikkopplæringen i prosjektet. På grunn av økende tendens til resistens mot antibiotika blant disse bakteriene, og behovet for nye medisiner mot ESKAPE patogener, vil bruken av *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae* og *K. pneumoniae* i opplæringseksperimenter være relevant, hvor nye funn kan brukes til videre forskning. Av de fire bakteriene brukt i forsøket er *Enterobacter cloacae* og *Klebsiella pneumoniae* fenotypisk bestemt til å være Ciprofloxacin resistente. Det vil si at resistensen ikke er bekreftet ved sekvensering, men resistensen er observert ved klinisk testing.

#### 1.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* er en gramnegativ stavbakterie og har en enkel flagell plassert på enden av cellen. Bakterien har respiratorisk stoffskifte, som vil si at den kun vokser under aerobe forhold. Bakterien vokser ved 35 – 42 °C på faste og flytende medier. *Pseudomonas* bakteriene forekommer naturlig i jord og vann, og trives i fuktige omgivelser. Kontaminering av bakteriene finnes på flere fuktige omgivelser, som i løsninger benyttet til desinfeksjon, i medisiner og på medisinske instrumenter. Bakteriene kan også finnes i enkelte matprodukter (Rollag et al., 2019, s.219). *P. aeruginosa* finnes i små mengder i tarmen hos relativt mange mennesker. Utover dette forekommer bakterien i liten grad i normalflora hos mennesker. Bakterien kan forårsake ulike infeksjoner, som blant annet bakteriemi (sepsis), pneumoni, urininfeksjoner og infeksjoner ved brannskader (Rollag et al., 2019, s.219). Bakterien har både toksiner og endotoksin, som kan forårsake svært alvorlige infeksjoner hos mennesker. I tillegg har bakterien høy resistens mot desinfeksjonsmidler og antibiotika forbindelser, og det er kun spesielle antibiotika (pseudomonasmidler) som virker mot og eliminerer bakterien (FHI, 2010c). Dette fører til en utfordring i behandling av pasienter med infeksjon av *P. aeruginosa* (Rollag et al., 2019, s.219).

### 1.2.2. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* er en bakterie som er en del av *Acinetobacter* slekten, som er frittlevende miljøbakterier som blant annet finnes i jord og vann. *Acinetobacter* er aerobe, korte, og tilnærmet runde staver, som er lite krevende ved dyrking. Disse bakteriene mangler flageller, men uttrykker fimbrier, som er av type IV pili lokalisert ved bakteriepolene. Bakterien bruker fimbria for fremdrift og mobilitet (Rollag et al., 2019, s.207). *A. baumannii* kan forårsake infeksjon i blod, urinvei, lunger eller i sår på kroppen. Bakterien forekommer i tillegg ofte på hud og slimhinner, og den kan kolonisere og leve i en pasient uten å gi infeksjon eller symptomer. Dette skjer spesielt i respirator sekresjoner eller i åpne sår (CDC, 2019). I motsetning til andre arter av *Acinetobacter* slekten blir *A. baumannii* som oftest alltid isolert fra sykehusmiljøer, særlig i forbindelse med vasker og utstyr som krever vann. *A. baumannii* er en bakterie som kan forårsake nosokomial infeksjon (sykehusinfeksjon) (Rollag et al., 2019, s.207). Disse bakteriene finner konstant nye veier for å unngå effekter av antibiotika som brukes for behandling av *Acinetobacter* infeksjoner. *A. baumannii* er i tillegg ofte multiresistent overfor antibiotika som brukes for behandling, og er blant annet en av WHO topprioriterte bakterier når det gjelder antibiotikaresistens (CDC, 2019).

### 1.2.3. *Enterobacter cloacae*

*Enterobacter cloacae* tilhører familien *Enterobacteriaceae* under ordenen *Enterobacterales*. Disse er gramnegative stavbakterier som er den del av normalfloraen hos mange dyr og mennesker. En rekke bakteriearter og slekter tilhører ordenen *Enterobacterales*. Disse artene kan ha flageller distribuert over hele cellen. *Enterobacterales* har i tillegg enkle vekstkrav. Bakteriene fermenterer glukose, reduserer nitrat og er katalasepositive og oksidasenegative. Dette gir bakterien egenskapen til å vokse i både aerobe og anaerobe miljø med ikke – selektive og selektive dyrkingsmedier. De fleste bakterieartene innen denne ordenen gir sjelden sykdom hos mennesker, noen av artene forårsaker ofte sykdom, mens enkelte arter gir nesten alltid sykdom. Sykdommer som forårsakes av bakterier i denne ordenen er blant annet urininfeksjon og bakteriemi (Rollag et al., 2019, s.184).

#### 1.2.4. *Klebsiella pneumoniae*

På lik linje som *Enterobacter cloacae* tilhører *Klebsiella* ordenen Enterobacterals. Slekten *Klebsiella* har en tykk kapsel som bidrar til bakteriens evne til å forårsake sykdom, og gir bakteriekoloniene en karakteristisk mukoide (slimete) utseende på dyrkningsagar (Rollag et al., 2019, s.191). *Klebsiella pneumoniae* er en bakterie som vanligvis finnes i kroppens normalflora, men bakterien kan forårsake alvorlig sykdom, som blant annet lungebetennelse, pneumoni, urinveisinfeksjon, sårinfeksjon, blodforgiftning og bløtdelsinfeksjoner (Sirevåg, 2009) og (Rollag et al., 2019, s.191).

### 1.3. Mykobakterier

Mykobakterier er den eneste slekten av bakterier i familien Mycobacteriace, og omfatter over 180 arter. Deriblant finnes *tuberkelbakterier* som fremkaller tuberkulose. Felles karakteristiske trekk for mykobakteriene er at de er rette eller lett bøyde staver, aerobe, ubevegelige, og ikke spordannede bakterier. Veksthastigheten er relativt langsom, og generasjonstiden varierer fra 2-20 timer. Mykobakterier har en cellevegg bestående av et høyt innhold av lipider og fettsyrer kalt mykolsyre. Dette øker vanskeligheten ved gramfarging. Det høye lipidinnholdet i celleveggen har en stor betydning for mikrobens fysiologi og virulens. Celleveggen har en uvanlig lav permeabilitet, som bidrar til mikrobenes resistens mot antibakterielle midler, vevsenzym og immunforsvaret. I tillegg inneholder celleveggen antigene proteiner og polysakkarider. Proteinene sørger blant annet for antistoffdannelse og tuberkulinreaksjon. Dette er en lokal betennelse i huden forårsaket av tuberkulin, som er et antigen fra tuberkulosebakterien. Det høye lipid innholdet gjør mykobakteriene relativt resistente mot inntørring og kjemisk desinfeksjon. Bakteriene overlever best i fuktighet, men kan holde seg infeksiose i lange perioder i inntørret støvpartikler. Eliminering av mykobakterier er mer tidskrevende enn andre mikrober, spesielt siden mykobakterier forårsaker tuberkulose. Bakteriene kan inaktiveres av kjemiske desinfeksjonsmidler bestående av eksempelvis fenoler, klor, aldehyder, alkoholer, og pereddikksyre, i tillegg til varme (Rollag et al., 2019, s.171-172).

### 1.3.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberkulose er forårsaket av bakterien *Mycobacterium tuberculosis*, som vist i Figur 2. Bakterien kalles også for *tuberkelbakterier*, og inngår i *M. tuberculosis* (MTB)-komplekset. Artene i MTB-komplekset er nær beslektet både på gennivå og i antigen profil. Ved mikroskopi av MTB observeres bakteriene som slanke staver i kliniske prøvemateriale eller kultur. Mikrobene danner ofte slangeformede bånd eller biofilmtråder i kultur. Disse er assosiert med et av de fire glykolipidene med mykolsyre på cellenes overflate, som kalles for cordfaktor. Cordfaktoren er knyttet til mykobakteriens virulens og antimikrobiell resistens. Liporarabinomannan (LAM) er et antigen som påvirker makrofager og cytokinproduksjon, og er en lipid-forbindelse med stor biologisk aktivitet i bakterien. Lipidene induserer de cellulære vevreaksjonene i granulomene, som innebærer tuberkeldannelse og nekrose (celledød). Dette er typisk for TB. MTB vokser best ved 37 °C og er en langsomt voksende bakterie hvor generasjonstiden er 14-15 timer (Rollag et al., 2019, s. 173).



Figur 2 viser *Mykobacterium tuberculosis* (Harper, 2019).

### 1.3.2. MTB stammer

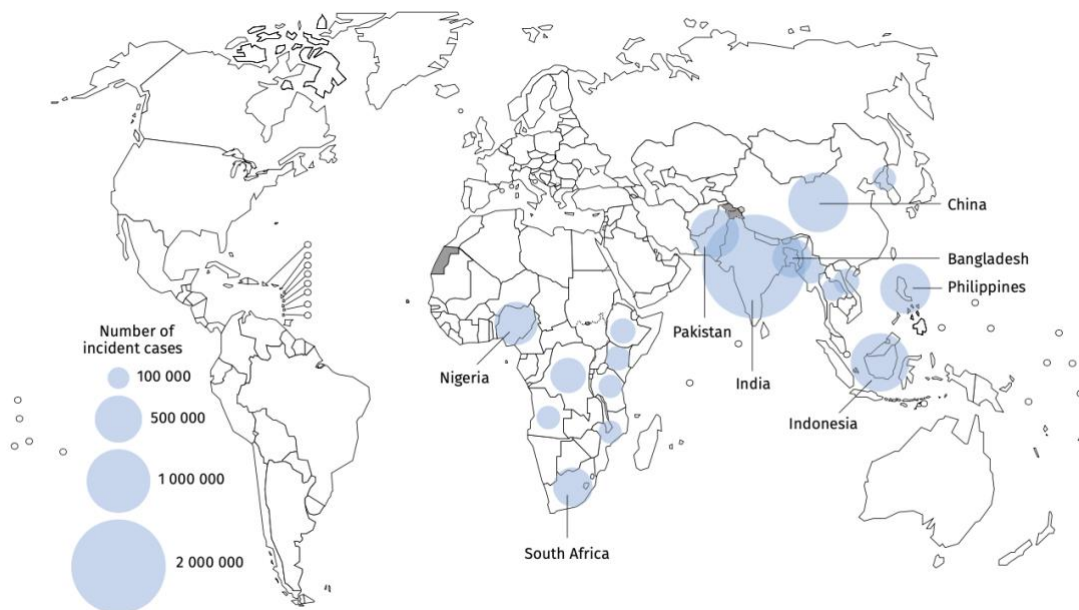
Det finnes mange stammer av *Mykobacterium tuberculosis* blant annet H37Rv og H37Ra (Dusthackeer et al., 2019). H37Rv var den første *M.tuberculosis* stammen som gjennomgikk en helgenomsekvensering. H37Rv er ikke i seg selv et direkte klinisk isolat, men den var avledet fra H37 som er den originale stammen fra en pasient i 1905. Fra den originale stammen ble det separert i to varianter, H37Rv og H37Ra som viste henholdsvis høy og lav virulens. H37Rv ble brukt i mange laboratorie studier og senere ble stammen brukt som standard for tuberkulose. Den blir ofte brukt som den primære referansestammen i

genombaserte studier hvor arbeidet omfatter *M.tuberculosis* fylogeni (hypotese om det evolusjonære slektskapet mellom arter, slektskapstre), molekylær epidemiologi og påvisning av resistantgivende mutasjoner (O'Toole & Gautam, 2017).

I dette prosjektet ble laboratoriestammen H37Rv, og to klinisk isolerte stammer med mutasjon i *katG* og *InhA* genet brukt for å teste 17 ukjente forbindelser for å observere hvilke forbindelser som hemmer bakterievekst, og dermed er potensielle kandidater til TB behandling. De kliniske isolatene er isolert fra pasientprøver på Rikshospitalet, Oslo Universitetssykehus.

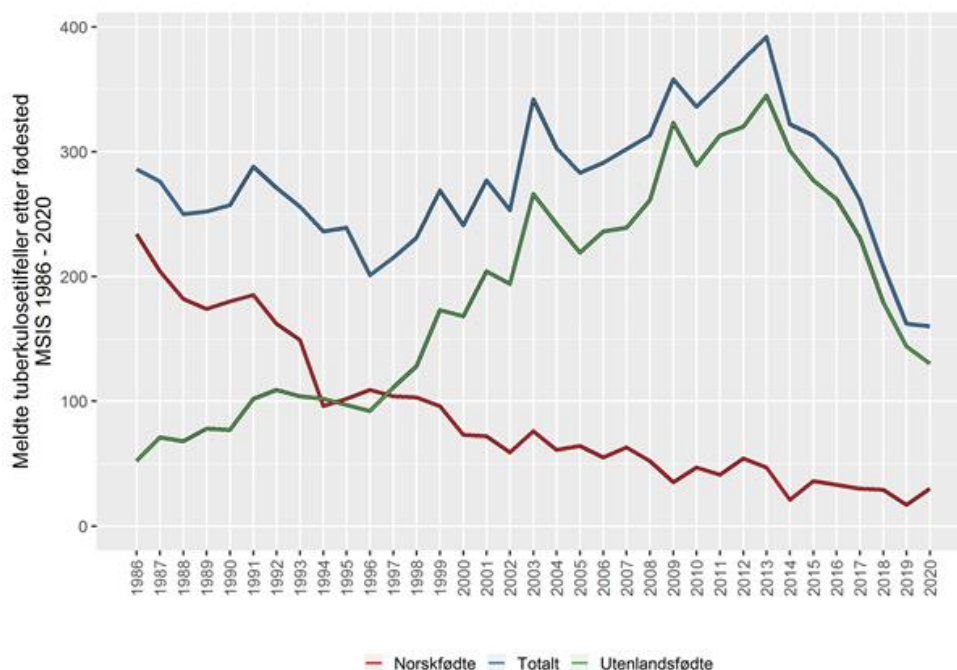
#### 1.4. Tuberkulose i Norge og verden

Tuberkulose er av de mest dødeligste infeksjonssykdommene i verden etter Covid-19. Generelt har forekomsten av TB være synkende med en rate på 2% i perioden 2015 – 2020. I 2020 ble nærmere 10 millioner mennesker diagnostisert med tuberkulose hvorav omtrent 1,5 millioner døde. Sykdommen rammer mennesker i alle verdensdeler. WHO anslår at omtrent ¼ av verdens befolkning har latent TB. Forekomsten er betydelig høyere i deler av Asia og Afrika. I 2020 ble 43% av TB forekomsten oppdaget i Sør-Øst Asia, 25% i Afrika, mens 18% av forekomsten ble oppdaget i Vestlig – Stillehavsregion. Høy forekomst av tuberkulose vil si at 40 per 100 000 innbygger eller mer har tuberkulose. Land som Ecuador, Libya, Marokko, Sri Lanka, Thailand og Ukraina har en slik tuberkuloseforekomst. Dersom forekomsten er høyere enn 200 tilfeller per 100 000 innbygger vil tilstanden klassifiseres som særlig høy (FHI, 2013). Land som India, Kina, Indonesia, Filipinene, Pakistan, Nigeria, Bangladesh og Sør-Afrika har særlig høy tuberkuloseforekomst, og stod for 2/3 av TB tilfellene i 2020. TB forekomsten på verdensbasis i 2020 er vist i Figur 3. I tillegg har forekomsten av multiresistent TB (MDR-TB) vært høy i disse åtte nasjonene. Forekomsten av MDR-TB har generelt vært stabilt på globalt sett. Problemet rundt MDR-TB er at en omfattende behandling med andregenerasjon-medikamenter må foretas over en periode på opp mot to år. Virkningene av slike medikamenter er dyre og toksiske (WHO, 2021a) og (WHO, 2021b).



Figur 3 viser de åtte landene som bidro til 2/3 av TB forekomsten i 2020, i tillegg til å illustrere forekomsten av TB på et globalt basis (WHO, 2021a).

I Norge er forekomsten av TB lav. Tallet på tilfeller og dødeligheten av TB i Norge har vært hurtig synkende siden slutten av 1940 – tallet. Figur 4 viser at den totale forekomsten av TB har vært mellom 200 – 400 innbyggere i Norge mellom perioden 1986 – 2020. Siden 2013 har tallet vært mindre enn 300 årlige tilfeller. Per 2020 er raten for TB i Norge på omtrent 3 tilfeller per 100 000 innbyggere. Nedgangen i TB forekomst skyldes stort sett bedre levestandard, og økt tilgang til vaksiner og effektive medikamenter (Arnesen et al., 2021).



Figur 4 viser den totale forekomsten av TB i Norge i perioden mellom 1986 – 2020 (Arnesen et al., 2021).



I Norge har tilfellene av antibiotikaresistens mot førstegenerasjon–medikamentene vært stabile og lave. Tilfellene av antibiotikaresistens mot Rifampicin (RIF), Isoniazid (INH), Pyrazinamid (PZA), Ethambutanol (EMB) eller Streptomycin (SM) har generelt vært lavere enn 15 årlige tilfeller i de siste årene, mens de årlige tilfellene av MDR – TB har vært mellom 4 – 11 tilfeller (Arnesen et al., 2021).

## 1.5. Diagnostikk av tuberkulose

### 1.5.1. Symptomer

Symptomer på tuberkulose avhenger av hvor og i hvilke organer bakterien befinner seg. Den mest vanlige formen for tuberkulose er lungetuberkulose, og denne formen er smittsom. Sykdommen utvikler seg som oftest langsomt noe som kan bety over flere måneder. MTB er et opportunistisk patogen, som vil si at bakterien fører til sykdom når miljøet i verten er gunstig for infeksjon. Dette fører til at mennesker kan være smittet med MTB i lang tid uten å være klar over det. Dette kan observeres hos mennesker med latent tuberkulose.

Smittebærende personer med latent tuberkulose er symptomfrie, er ikke smittsomme og har ikke aktiv sykdom. De er i risiko-sone når sykdommen går over fra latent til aktiv form. Hos personer med latent TB vil sykdommen utvikle seg langsomt, og det kan ta over flere år før symptomene vises. De vanligste symptomene på tuberkulose kan være langvarig hoste med oppspytt (celler og slim fra bronkialtreet som hostes opp fra de nedre luftveiene), vekttap, nedsatt allmenntilstand, feber og nattesvette. De mer sjeldne symptomene kan være brystmerter, tungpusthet og blodtilblandet oppspytt. Hovedsymptomene ved lungetuberkulose er hoste og oppspytt. Symptomene er lite spesifikke for tuberkulose i og med at de kan observeres ved mange type sykdommer. Sene allmennsymptomer som trøtthet, slapphet, manglende appetitt, vekttap, feber og nattesvette varsler om langkommet sykdom. I tillegg til lungetuberkulose kan sykdommen ramme andre organer, deriblant lymfekjertler eller skjelett (FHI, 2010a) og (NHI, u.å.-b).

### 1.5.2. Detektering

Påvisning av tuberkulosesmitte kan gjøres på to måter: en hudprøve (Mantoux) eller en blodprøve. Mantoux går ut på at man setter en liten sprøyte på underarmen hvor man injiserer tuberkulin-stoff i huden. Prøven leses av etter tre døgn hvor hevelsen måles i millimeter. Dersom hevelsen er over 6 mm regnes prøven som positiv. Metoden kan gi mange falske positive resultater hvor prøven vil vise positive resultatet uten at pasienten er smittet. Årsaken til falske positive resultater kan blant annet forekomme dersom pasienten har gjennomgått BCG-vaksinasjon, hatt infeksjon med atypiske mykobakterier og utviklet boostereffekt etter gjentatt tuberkulintesting (FHI, 2010a). Positiv Mantoux test må derfor bekreftes med en Interferon- Gamma Release Assay (IGRA). IGRA er en metode med høy spesifisitet for deteksjon av tuberkulose ved at det skilles mellom smitte forårsaket av MTB komplekset eller gjennomgått BCG-vaksinasjon. Metoden baseres på blodprøver og anvendes for diagnostikk av latent tuberkulose i risikogrupper og ved smittesporing. IGRA er en mer sikker metode. Testen baserer seg på at T-celler fra blod stimuleres med peptider fra antigener som er spesifikke for MTB. Dersom cellene responderer med sekresjon av Interferon gamma molekyler (INF- $\gamma$ ), indikerer dette til at det foreligger en tuberkuloseinfeksjon hos pasienten. IGRA-test kan være både positiv ved latent og aktiv tuberkulose, men kan ikke brukes for å differensiere disse tilstandene. Tolkning av IGRA resultater gjøres ved mikrobiologisk laboratorium (FHI, 2010a). I dag er IGRA den mest brukte undersøkelsesmetoden. Mantoux er en metode som er enklere å utføre enn IGRA, spesielt for små barn, og siden det er kun IGRA som oftest er tilgjengelig i mange sykehus, er begge metodene like nyttige for påvisning av tuberkulose (Arnesen, 2014) og (FHI, 2010a).

Det er vanlig å ta røntgen ved mistanke om lungetuberkulose. Røntgen tas ofte etter undersøkelser som har gitt positivt testresultat, men det kan også gjøres som første undersøkelse, eller som et ledd i screening. Røntgenforandringer er den viktigste indikasjonen på lungetuberkulose, men er alene ikke diagnostisk. Dersom røntgen viser tegn til tuberkulose, vil funnene bli styrket gjennom ulike faktorer. Dette kan være om pasienten har symptomer på tuberkulose, har vært eksponert for tuberkulose ved eksempelvis å ha oppholdt seg i lenger tid i områder med høy forekomst av tuberkulose, og har positivt IGRA eller Mantoux (FHI, 2010a).

Røntgenfunn som gir mistanke om mulig tuberkulose blir videre undersøkt ved en mikrobiologisk undersøkelse. Dette blir gjort ved å ta prøver fra luftveiene, og ved mistanke

om tuberkulose utenfor lungene blir det tatt prøver fra andre organer. Dette er nødvendig for bekreftelse av sykdomsmistanker, og for å sikre endelig og konkret diagnose. Prøver og undersøkelser kan utføres ved mikroskopi, genteknologiske undersøkelser og bakteriologisk dyrkning. Bakteriologisk undersøkelse er den viktigste metoden for diagnostikk og kontroll av behandlingseffekt. Undersøkelsene vil kunne si noe om graden av smittsomhet. Ved mistanke om tuberkulose utenfor lungene kan også andre undersøkelsesmetoder være aktuelt (Arnesen, 2014).

### 1.5.3. Behandling

Tuberkulose er en sykdom som kan behandles med antibiotika. Behandlingen er langvarig på grunn av at tuberkulosebakterien deler seg langsomt, og det vil dermed ta tid for medisinene å eliminere alle bakteriene i kroppen. Med korrekt behandling av lungetuberkulose i begynnelsen av sykdomsforløpet vil sykdommen være mindre smitteførende. Det er viktig å være konsistent med behandlingen, og behandlingen bør ikke avsluttes tidlig i og med at noen av bakteriene kan overleve i kroppen og sykdommen kan komme tilbake. Bakteriene kan utvikle resistens mot antibiotika og dette fører til at behandling av tuberkulose er krevende. Ved et slikt tilfelle må det tas i bruk flere typer antibiotika over lenger tid (Arnesen, 2014). Resistent MTB kan utvikles av ulike årsaker. Dette kan eksempelvis skyldes feil sammensetning av antibiotika for behandling. Resistens kan også utvikles dersom pasienten har fått for lav dose, pasienten har utelatt noen doser eller om pasienten har tatt lange avbrudd i behandlingen. I tillegg kan resistensutviklingen ha forekommet ved at pasienten ha blitt smittet med bakterier som allerede er resistente, eller at pasienten har fått behandling i et inkompetent behandlingsapparat som har resultert i feilbehandling (LHL, u.å.). For å sikre helbredelse og hindring av resistensutvikling er det derfor meget viktig at all behandling gjennomføres fullstendig. Med medikamentell behandling vil pasientene helbredes raskt og effektivt, i tillegg til å forhindre mulighet for resistens og spredning av sykdom (FHI, 2010b).

Behandlingen starter ved bruk av ulike typer antibiotika. Første-generasjon antibiotika forbindelser (FLD) er de mest effektive og mest bruke medikamentene til behandling av TB pasienter. FLD inkluderer RIF, INH, PZA, EMB og SM. Første-generasjon forbindelser brukes til behandling av pasienter med TB som hovedsakelig skyldes av MTB uten mutasjoner, og MTB som kun er resistente mot få av de overnevnte medikamentene. Behandling startes ofte med en intensiv behandling med de fem nevnte medikamentene i en

periode på to måneder. Deretter vil pasienten få en behandling med kun INH og RIF i fire måneder. Dersom bakteriene har spredd seg utenfor lungene vil behandlingen vare lenger, vanligvis ni til 12 måneder. Behandlingsopplegget påvirkes av hvilke medisiner som skal gis til pasienten, som videre påvirker varigheten av behandlingen. Hvilke medisiner som skal gis til pasienten og varigheten av behandlingen avhenger av alder, generell helsetilstand, resultat av resistenstester, og om pasienten har aktiv tuberkulose eller latent tuberkulose (NHI, u.å.-a), (HelseNorge, u.å.) og (Jnawali & Ryoo, 2013).

#### 1.5.4. Isoniazid og Rifampicin

INH er en av de mest effektive TB medikamentene på markedet siden 1952. En konsentrasjon av forbindelsen på 0,02 – 0,2 µg/mL er tilstrekkelig for å eliminere MTB ved at forbindelsen kommer inn i bakteriene via passiv diffusjon. Aktiv INH sørger for hemming av dannelsen av mykolsyrer i bakterien. Dette fører til inaktivering av protein reduktaser, og det ledes dermed til bakteriell død. MTB med mutasjoner i *katG* genet, *inhA* genet, eller promotorsekvenser tilhørende *inhA* genet, er resistente mot INH. Forbindelsen aktiveres av KatG enzymet i MTB. Når mutasjoner forekommer i *katG* genet vil bakteriene utvikle en resistens mot INH. Dette skyldes av at genproduktet av mutert gen fører til tap av katalase – og peroksidase aktivitet (Jnawali & Ryoo, 2013).

RIF er en første-generasjon antibakteriell forbindelse som ble introdusert på markedet i 1972. RIF bindes til β – subenheten av RNA polymerase komplekset. På denne måten vil RIF sørge for hemming av transkripsjon av MTB gener, og proteinsyntese vil dermed ikke forekomme. Dette påvirker funksjonen av bakterien, og resulterer i celledød. MTB med resistens mot RIF har som oftest mutasjoner i *rpoB* genet, som koder for β – subenheten av RNA polymerase i bakterien. Mutasjonen sørger for en konformasjonsendring i polymerasen slik at det forekommer en reduksjon i affiniteten mellom polymerasen og RIF (Jnawali & Ryoo, 2013).

#### 1.5.5. Pyrazinamid, Ethambutanol og Streptomycin

PZA er en essensiell forbindelse som brukes i behandling av pasienter med multiresistent TB. PZA må undergå en endring til sin aktive form, pyrazinsyre, for å utøve sin aktivitet. Omdannelsen skjer ved hjelp av enzymet pyrazinamidase. Enzymet kodes av *pncA* genet, og en mutasjon i genet fører til en reduksjon av enzymaktiviteten. Dette påvirker aktiveringen av PZA i PZA resistent MTB (Jnawali & Ryoo, 2013).

EMB er en første-generasjon antibiotika som hindrer bakterievekst ved å forstyrre syntesen av bakterielle komponenter i celleveggen. Mutasjon i *embB* genet kan lede til at aktiviteten av EMB relatert polymerisering av cellevegg komponenter bli kompromittert (Jnawali & Ryoo, 2013).

SM er en forbindelse som bidrar til celledød av MTB ved å binde seg til 16S rRNA (ribosomalt RNA). Dette sørger for å forstyrre korrekturlesningen under translasjonsprosessen av gentranskripter. Dette resulterer i stopp av translasjonsprosessen av mRNA til funksjonelle proteiner. En resistens i gener som koder for 16S rRNA, eksempelvis *rrs* og *rpsL*, vil føre til resistens mot SM (Jnawali & Ryoo, 2013).

#### 1.5.6. Andre-generasjonsmedikamenter mot multiresistent TB

Dersom MTB har utviklet resistens mot ett eller flere medikamenter vil andre behandlingsopplegg brukes. Multiresistent TB (MDR-TB) vil si at MTB bakteriene er resistent mot både INH og RIF, som er de to forbindelsene som brukes aktivt for behandling av tuberkulose. Multiresistente bakterier kan behandles, men behandlingen kan være svært langvarig og kostbar. Det er i tillegg viktig at de resistente tuberkulosebakteriene ikke spres. God pasientoppfølging er dermed en viktig del av behandlingen. Extensively Drug-Resistant TB (XDR-TB) forekommer når bakterien er resistent mot flere anti-TB legemidler, i tillegg til INH og RIF. Dette fører til at bakterien reagerer på færre tilgjengelige medisiner. Ved MDR-TB og XDR-TB kreves bruken av andre-generasjon-medikamenter, som generelt er mer kostnadsdrivende og langt mer toksiske mot mennesker enn FLD. Dette setter grunnlaget for forskning innen oppdagelsen av nye andre-generasjon forbindelser som i større grad kan brukes for behandling av MDR-TB (NHI, u.å.-a) og (Jnawali & Ryoo, 2013).

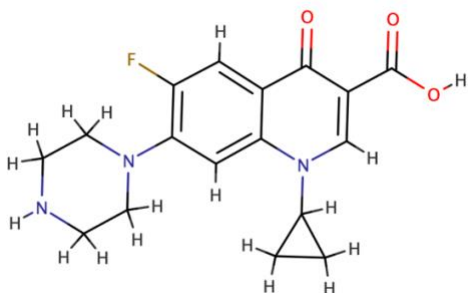
Etablerte andre-generasjonsmedikamenter mot MTB inkluderer blant annet forbindelser som Ciprofloxacin, Kanamycin, Ethionamid, *p*-amino salisylsyre og Cycloserine. Disse medikamentene brukes som andre-generasjonsbehandling mot blant annet MDR-TB og XDR-TB fordi forbindelsene har evnen til å indusere bakteriell celledød, også i bakterier som ikke deler seg. Ulempen ved bruk av slike forbindelser er deres toksisitet mot vertsceller. Toksiske effekter kan blant annet være senebetennelse, effekter på sentralnervesystemet, hypoglykemi (lavt blodsukkernivå), leverskade og allergiske reaksjoner. Dette bidrar til økt

engasjement rundt oppdagelsen av nye andre-generasjon forbindelser til behandling av MDR-TB og XDR-TB som har mindre toksiske effekter i pasienter (Jnawali & Ryoo, 2013) og (Fookes, 2018).

## 1.6. Testforbindelser

I prosjektoppgaven er 17 nye testforbindelser brukt. Forbindelsene er designet og kjemisk syntetisert av samarbeidspartnere til Genomdynamikk gruppen. I denne oppgaven er ikke forbindelsene navngitt. Dette skyldes at forskningsarbeidet per 24.05.2022, ikke er publisert. Forbindelsene vil derfor henvises til som Forbindelse 1 – 17.

Figur 5 viser den kjemiske strukturen av andre-generasjon antibiotika-forbindelsen Ciprofloxacin  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ , som er kontrollforbindelsen brukt i screening av testforbindelsene 1-17 mot MTB stammer. Ciprofloxacin er et 4 – hydroksykinolin molekyl som har syklopropyl, karboksylsyre, fluorid, og piperazin-1-yl substituenten på henholdsvis posisjon 1, 3, 6 og 7.



Figur 5 viser to – dimensjonal kjemisk struktur av Ciprofloxacin (NCBI, 2022).

Mekanismen til Ciprofloxacin i MTB involverer hemmingen av DNA gyrase, som er et enzym i bakterier. Enzymet fører til oppkveiling av i DNA heliksen og sørger for katalyse av separasjon av datterkromosomer. Ciprofloxacin binder seg selektivt til bakterielt DNA og hemmer aktiviteten av DNA gyrase. Dette resulterer i dobbeltrådig DNA-brudd. I tillegg er Ciprofloxacin et lipofilt molekyl som har evnen til å interagere med  $Mg^{2+}$  ioner.

Interaksjonen oppnås når forbindelsen har elektrostatiske interaksjoner med fosfodiesterer på MTB membranen. Dette resulterer i høy permeabilitetsgrad av den tykke MTB celleveggen. Resistens mot Ciprofloxacin involverer ofte mutasjoner i gener som koder for DNA gyrase. Enzymet består av to subenheter kodet for av genene *gyrA* og *gyrB* (Blondeau, 2004).

Mutasjoner i et eller flere av de enzymkodende genene vil føre til resistens mot Ciprofloxacin (Knoll et al., 2021), (Jnawali & Ryoo, 2013) og (Fookes, 2018).

### 1.7. Bakgrunn for prosjektet

I denne oppgaven var hensikten å teste nye forbindelser mot tuberkulosebakterier for å finne potensielt nye medikamenter som hemmer antibiotikaresistente MTB bakterier. De nye forbindelsene ble testet mot antibiotika-resistente gramnegative ESKAPE-bakterier og kliniske MTB isolater. Gjennom prosjektet ble vi opplært i ulike steg innenfor testing av forbindelser som inngår i prosessen for oppdagelse av nye medikamenter.

Prosjektet ble delt i tre deler hvor første del av prosjektet foregikk i laboratorium med innslutningsnivå 2. I denne delen av prosjektet ble vi opplært i arbeid med ulike gramnegative bakterier som en teknikkopplæring. Her ble vi opplært i generell dyrking av ulike gramnegative bakterier med ulike vekstmetoder. Hensikten med denne delen av prosjektet var å tilegne seg kunnskap om screening av testforbindelser mot ulike gramnegative bakterier. Ved screening av disse bakteriene ble vi introdusert til metodene diskdiffusjon og MicroBroth Dilution. Arbeid i innslutningsnivå 2 lab forberedte oss til del 2 av prosjektet, som var hoveddelen av prosjektet og foregikk i innslutningsnivå 3. Her ble 17 testforbindelser screenet mot ulike stammer av MTB ved bruk av MABA assay som analysemetode. I siste del av prosjektet fikk vi en introduksjon i forsøk med eukaryot cellekultur, og ulike steg som involveres i prøvebehandling av mammalske celler. For å teste toksisiteten til testforbindelsene ovenfor humane celler ble MTT assay benyttet ved bruk av HEK-293 celler.

## 2. Materialer og metoder

I dette kapitlet er prosedyren for forsøkene utført i de tre delene av prosjektet beskrevet. I tillegg er informasjon om sikkerhet og sterilisering gitt i kapitlet. Informasjon om utstyr, kjemikalier, og bakterier og celler brukt i utførelsen av prosjektet, er angitt i Vedlegg 1.

### 2.1. Innslutningsnivå 2 og 3

Laboratoriearbeidet knyttet til prosjektet ble utført på laboratorier med innslutningsnivå (BioSafety Level, BSL) nivå 2 og 3. Laboratorier klassifiseres etter BSL nivå 1 – 4 hvor laboratorier på nivå 1 er lab for arbeid med organismer som anses lite sannsynlig for sykdomsdannelse, mens laboratorier med nivå 4 har strengest regler og tiltak for helse, miljø, og sikkerhet for personell, miljø og eksperimenter. Hvert BSL nivå har spesifikke kontroller for innslutning av mikroorganismer. Nivået av laboratorier bestemmes av faktorer som type mikrobe brukt i forsøk, smittsomhet, eksponeringsvei og alvorlighetsgrad ved eventuell infeksjon (CDC, u.å.-b). Som Tabell 1 viser vil arbeid i BSL 2 laboratorium utføres på blant annet mikrober som i moderat grad eksisterer i samfunnet hvor risiko for sykdom kan variere. Arbeid med mikroorganismer som *Samonella* og Hepatitt B virus inngår i BSL 2 nivå (CDC, 2009).



Tabell 1 angir beskrivelse av de fire BSL nivåene, hvilke organismer og type patogener som brukes til arbeid ved ulike nivåer, og krav til fysisk sterilisering i laboratorium (Bathula & Rakhimol, 2017).

	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4
Beskrivelse	- Ingen betydelig kontaminasjon - Bruk av organismer som stor usannsynlighet for sykdomsdannelse	- Kontaminert laboratorium - Moderat risiko - Bruk av organismer som fører til sykdom av ulik alvorlighetsgrad	- Høyt kontaminert laboratorium - Aerosoloverføring - Alvorlig/potensielt dødelig sykdom	- Maksimal kontaminert laboratorium - Eksotiske organismer med høy risiko for dannelse livstruende sykdom
Prøveorganisme	<i>E. Coli</i>	Influenza, HIV, Borreliose sykdommer	Tuberkulose	Ebola virus
Patogen type	Organismer som utgjør minimal potensiell fare for personell og miljø	Organismer assosiert med menneskelig sykdom, og utgjør moderat fare for personell og miljø	Lokale eller eksotiske organismer som utgjør et potensial for aerosoloverføring, og organismer som forårsaker alvorlig eller potensielt dødelig sykdom	Farlige og eksotiske organismer som utgjør en høy risiko for aerosoloverførte laboratorieinfeksjoner og livstruende sykdommer
Krav til sterilisering med autoklav	Ingen	Ingen	Krav til autoklav med Bioseal i laboratorierommet	Krav til autoklav med Bioseal i laboratorierommet

Totalt fem bakterier ble brukt i vårt prosjekt: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* og MTB. Arbeid med de fire førstnevnte bakteriene ble utført ved BSL 2 laboratorium hvor generelle tiltak for sterilteknikk, som bruk av hansker, arbeid i avtrekksskap og desinfeksjon med 75% etanol, ble fulgt. I tillegg til arbeid med gramnegative bakterier ble cytotoxisk arbeid utført i laboratorium med BSL 2 klassifisering. Forsøk knyttet til MTB screening ble utført i et BSL 3 laboratorium, som har undertrykk, retningsstyrt luftstrøm, handsfree vask og sluse. Et slikt laboratorium krever høyere grad av sterilteknikk, og personlig, eksperimentell- og miljøsikkerhet enn laboratorium på BSL 2 nivå. Arbeid i BSL 3 laboratorium utføres ved blant annet forskning hvor arbeid med mikroorganismer som smittes ved luftveisoverføring, og som potensielt fører til dødelig infeksjon, utføres. Arbeid med mikrober som MTB og *Coxiella burnetii* foregår i BSL 3 nivå (CDC, 2009).

Laboratoriesikkerhet knyttet til MTB arbeid ble utført i henhold til Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual fra WHO. For personlig sikkerhet ble smittevernsutstyr, som smittevernsfrakk, dobbelt lag av hansker og åndedrettsvern med tildekket ventil (FFP3), brukt. Øverste lag av hansker ble regelmessig byttet for å overholde personlig sikkerhet og unngå kontaminering av forsøkene. For videre ivaretagelse av eksperimentell -og miljø sikkerhet ble LifeClean brukt for å desinfisere alt som tas ut av avtrekkskap og alt utstyr som har vært i direkte kontakt med MTB. LifeClean er et kjemisk, vannbasert desinfeksjonsmiddel som inneholder 0,02% ClO<sub>2</sub> som sørger for å eliminere blant annet MTB og sporer på to minutter (LifeClean-International, u.å.). Alt biologisk og kjemisk avfall ble sortert og sterilisert før videre avfallshåndtering. For å unngå kontaminering av MTB i miljøet ble alt arbeid utført i avtrekkskap med HEPA-filter, som er et filter som sørger for å hindre utslipp av aerosoler med infeksiose organismer ut av avtrekkskapet (WHO, 2012).

## 2.2. Sterilisering av utstyr og næringsmedier

Sterilisering går ut på å eliminere all form for levende mikrober i et område eller miljø (SML, 2009). Ulike teknikker som, fysisk og kjemisk sterilisering, brukes for sterilisering av utstyr og næringsmedier. Kjemisk sterilisering går ut på bruken av kjemikalier for eliminering av mikroorganismer. Kjemiske løsninger med alkoholer, klor, fenoler, klordioksid og hydrogenperoksid virker desinfiserende på blant annet overflater og utstyr (Myrvang, 2009). I våre forsøk er LifeClean og 75% etanolbasert middel brukt for utførelsen av kjemisk sterilisering av overflater og generelt laboratorieutstyr. Sterilfiltrering, stråling og varmebehandling er ulike fysiske steriliseringsmetoder som brukes i mikrobiologi. I prosjektet har bruken av varmebehandling i autoklav vært en teknikk for sterilisering av næringsmedier. En autoklav er en trykkoker som bruker overtrykk av vanddamp ved 1 atm for sterilisering ved 121 °C i 20 min (Lobert, 2021) finne ny kilde. Slik sterilisering brukes for å drepe mikroorganismer i og med at de fleste mikrober har en maksimal veksttemperatur under vannets kokepunkt (med unntak av hypertermofile organismer). Høye temperaturer, som 121 °C, fører til denaturering av proteiner og enzymer i bakterier, og sørger for å eliminere bakteriell kontaminasjon i næringsmedier (Lorente, 2021) finne ny kilde og (SML, 2009).

### 2.3. Tillaging av vekstmedium

Ulike bakterier krever ulike vekstbetingelser for å ha optimal vekst for bruk i forsøk. Medier med ulike vekstfaktorer bidrar til optimale forhold for binær fisjon (celledeling av én bakteriecelle til to identiske celler) av ulike bakterier. I prosjektet ble ulike medier, som 7H9 og Mueller Hinton medium (M.H. Medium), brukt for dyrking og isolering av bakterier, mens DMEM medium ble brukt i utførelsen av MTT assay med HEK-293 celler.

#### 2.3.1. Mueller Hinton medium

M.H. Medium 2 er et velegnet medium for bruk i forsøk med ulike type bakterier, inkludert aerobe mikrober som *P. aeruginosa*. Mediet inneholder 2,0 g/L beef infusion solids og 17,5 g/L kaseinhydrolysat (Merck, u.å.-b). Disse stoffene virker som en karbon- og nitrogenkilde, i tillegg til å supplere vitaminer, aminosyrer og svovel. Mediet inneholder 1,5 g/L stivelse for å sørge for å absorbere eventuelle toksiske metabolitter som produseres av forsøksbakteriene i løpet av ulike vekstfaser. M.H. mediet kan brukes som både væskemedium og fast medium med agar. I tillegg til næringsinnholdet i flytende medie vil M.H Agar inneholde 17,0 g/L agar. Dette er en forbindelse fra alger og brukes som størkningsreagens i ulike medier (Song et al., 2012) og (Merck, u.å.-b).

M. H. Medium ble brukt til diskdiffusjon og MicroBroth Dilution med *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae* og *K. pneumoniae*. Mediet i væskeform ble preparert ved å blande 11 g M.H. Medium 2 og 500 mL destillert vann i en 500 mL flaske. Mediet ble autoklavert ved 121 °C i 20 min. Flasken ble oppbevart i kjølerom ved 4 °C. M.H agarplater ble brukt til dyrking og isolering av ulike bakteriekolonier. Platene ble preparert ved å blande 19 g M.H Agarpulver og 500 mL destillert vann i en Erlenmeyerflaske. Mediet ble satt til autoklaving ved 121 °C i 20 min. 25 mL av agar mediet ble overført til petriskåler. Skålene ble plassert i avtrekksskap i 10 – 15 min for stivningsprosessen av agaren. Agarskålene ble forseglet i plastikkpose og oppbevart i kjølerom ved 4 °C.

Alle medier ble oppbevart i kjølerom ved 4 °C for å unngå bakteriell vekst ved eventuell kontaminering, og for å unngå dehydrering grunnet fuktighetstap (ThermoFisher, u.å.-f). Primærkulturer av bakterier kan også lagres ved 4 °C. Dette utføres på basis av å redusere enzymatisk og metabolsk aktivitet hos bakterier slik at bakterieveksten reduseres.

### 2.3.2. 7H9 Medium

7H9 medium er et velegnet vekstmedium for forsøk med ulike arter av Mykobakterier. MTB har raskest vekstrate i flytende medium. Av den grunn ble 7H9 medium brukt til preparering av primær -og subkulturer av ulike MTB bakteriestammer. I tillegg ble mediet brukt i utførelsen av MABA assay. 0,94 g 7H9 pulver, 180 mL destillert vann og 400 µL glyserol ble tilsatt i en 500 mL flaske (BD, u.å.-b). Mediet ble autoklavert ved 121 °C i 20 min og satt til oppbevaring ved 4 °C. 7H9 medium har en rekke næringsstoffer som bidrar til optimalt miljø for bakterievekst. Glyserol, albumin og dekstrose er stoffer som bidrar til vekst. Albumin vil i tillegg beskytte Mykobakterier mot toksiske fettsyrer ved å binde seg til fettsyrene. Katalase i mediet minimerer toksiske effekter på bakterier ved å ødelegge toksiske peroksider. Mediet inneholder i tillegg natriumsitrat, som er en forbindelse som kan konverteres til sitronsyre. Denne syren vil bidra til å holde ulike uorganiske salter, som sinksulfat, kobbersulfat, kalsiumklorid og magnesiumsulfat, i mediet. Ammoniumsulfat i mediet fungerer som en nitrogenkilde (Avantor-vwr, u.å.) og (BD, u.å.-b).

Før bruk av mediet i forsøk med MTB ble 20 mL Oleic Albumin Dextrose Catalase (OADC) og 500 µL av 20% Tween 80 løsning tilsatt til 7H9 mediet. OADC er et supplement som består av Oleic acid, bovine albumin, dekstrose, og katalase, og tilsettes til 7H9 mediet for å tilføre supplerende næring. OADC supplementet øker konsentrasjonen av bovine albumin, dekstrose, og katalase, som allerede finnes i 7H9 mediet. Oleic Acid er en essensiell fettsyrekjede for metabolismen av Mycobacterium. Tween er en polysorbat forbindelse som brukes som en emulgator. Tween sørger god permeabilitet av forbindelser inn i bakteriecellen, og sørger for at ulike forbindelser kan interagere med celleinnholdet (Sebastian et al., 2020). I tillegg vil tilsetning av Tween sørge for å unngå klumping av MTB bakterier i mediet (Ollinger et al., 2013), (Merck, u.å.-a) og (Sigma-Aldrich, u.å.-b).

### 2.3.3. 7H10 Agar

7H10 Agar er et velegnet medium til dyrking og isolering av rene MTB kolonier. 7H10 Agar inneholder mye av det samme innholdet som 7H9 medium, som blant annet oleic acid og albumin. Forskjellen mellom mediene er blant annet konsentrasjon av næringsinnhold. I tillegg er Oleic Acid inkludert i 7H10 agar, mens for 7H9 mediet må denne syren tilsettes separat på laboratoriet. 7H10 kan prepareres ut fra 7H10 pulver, men til våre forsøk ble ferdigkjøpte 7H10 Agar plater med 10% OADC brukt (BD, u.å.-a).

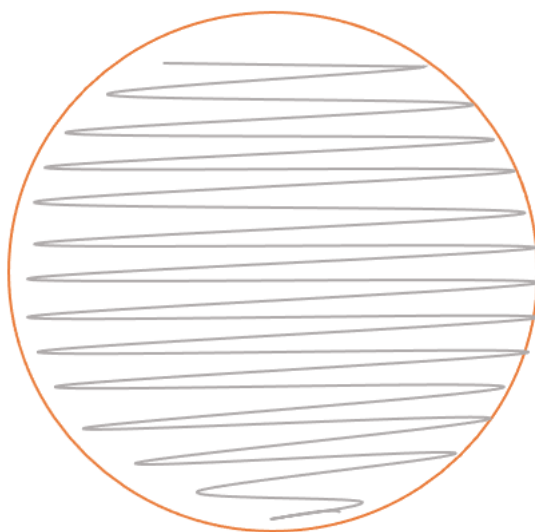
#### 2.3.4. DMEM medium

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) er et unikt medium på grunn av at mediet inneholder fire ganger konsentrasjonen av aminosyrer og vitaminer enn andre medier som brukes for celledyrking. Mediet er velegnet til dyrking av diverse mammalske celler. Sammensetningen av komponenter i DMEM medium gjør mediet til et ideelt supplement for de fleste cellekulturer. DMEM inneholder ingen proteiner, lipider eller vekstfaktorer, og krever derfor supplementer som kan bidra til optimale forhold for cellevekst (ThermoFisher, u.å.-b). DMEM medium brukt i våre forsøk var ferdigkjøpt med høyt innhold av glukose. Mediet ble supplert med 10% Fetal bovine serum (FBS) og 1% Penicillin Streptomycin (PS). FBS bidrar med essensielle vekstfaktorer for vedlikehold og vekst av dyrkede celler, og blir brukt som et supplement til basalt vekstmedium for cellekultur applikasjoner. FBS er det mest brukte serumet grunnet at det gir det mest robuste kultursystemet for et bredt spekter av cellyper (ThermoFisher, u.å.-c). PS er en effektiv antibiotikaløsning for et bredt spekter av ulike bakterier ved dyrking av cellekulturer fra mammalske celler. PS brukes for å opprettholde et sterilt miljø i cellekulturen og dermed kontrollere bakteriell forurensning. Antibiotika har få negative effekter på dyrkede celler siden Penicillin virker direkte på bakteriell cellevegg og indirekte ved å utløse enzymer som ytterligere endrer celleveggen (Sigma-Aldrich, u.å.-a). Streptomycin virker ved å binde seg til en underenhet av det bakterielle ribosomet. Dette fører til hemming av proteinsyntese og død hos bakterier (ThermoFisher, u.å.-e).

#### 2.4. Bakteriedyrking

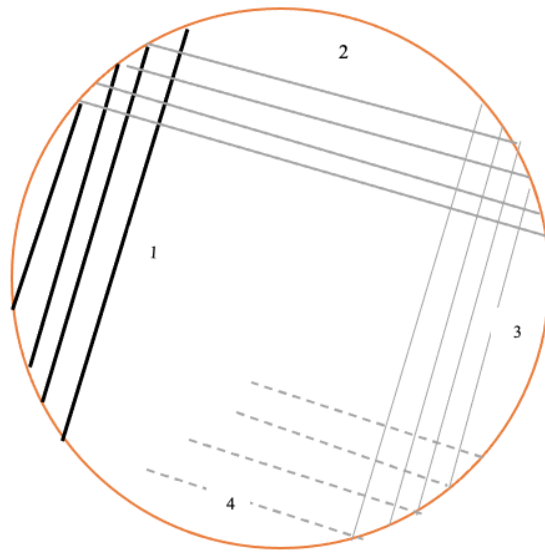
Utstryk er en teknikk som brukes for å dyrke og isolere en ren bakteriestamme fra en enkel art av mikroorganismer, eksempelvis bakterier. Det finnes ulike metoder for utstryk av bakterier, deriblant «continuous» og «quadrant» utstryk. Utstryk av bakterier er en prosess med isolasjonsfortynning av bakterier, som utføres ved å fortynne en forholdvis stor konsentrasjon av bakterier til en mindre konsentrasjon. Ved første stryk på et område av en agarplate vil en stor mengde av mikroorganismer avsettes, som resulterer i vekst av bakterier på hele utstryksoverflaten. Mellom hvert utstryk på ulike områder vil det avsettes færre og færre mikroorganismer for hver gang som prosessen utføres. Prosessen vil føre til fortynning av prøven som ble plassert i den første delen av agaroverflaten, og isolerte enkeltkolonier vil formes på overflaten med lavest bakteriell konsentrasjon.

«Continuous streak» er en utstryksmetode som brukes for å isolere rene bakteriekolonier fra en bakteriekultur. Utstryk av bakterier ble utført med sterilt utstyr, som inkluderer en bomullspinne eller en steril plastikk øse. Teknikken ble utført enten ved at én bakteriekoloni ble plukket opp fra en agarplate med en øse, eller ved at øsen forsiktig ble dyppet ned i en bakteriekultur. Deretter ble øsen med bakterier smurt på et lite område av agarplaten. Prosessen med utstryk ble utført ved å bevege øsen fra toppen til bunnen av agarplaten i en kontinuerlig bevegelse, som vist i Figur 6. Under utstryk ble det brukt tilstrekkelig trykk uten å ødelegge agaren.



*Figur 6 viser utstryk av bakterier med «Continuous streak» metoden.*

I tillegg til «Continuous streak» metoden kan «quadrant streaking» brukes for å isolere rene enkeltkolonier fra en enkelt bakteriecelle. Teknikken ble utført ved at bakterier fra en løsning ble smurt på et lite område av agarplaten med en steril øse. Bakteriene ble strøket på agarplaten ved å bevege øsen fram og tilbake på en fjerdedel av agarplaten. Platen ble rotert omtrent 90 grader, og et nytt utstryk ble foretatt ved å stryke fra endedelen av første stryk ved å bevege øsen fram og tilbake på samme måte som for første stryk. Tredje og fjerde utstryk ble utført på samme måte ut i fra de forrige utstrykene, som vist i Figur 7. Teknikken brukes for å få en fortykning mellom 1. -og 4. kvadrant.



Figur 7 viser utstryk av bakterier med «Quadrant streaking» metoden hvor bakteriekonsentrasjon på agarplaten minker fra 1. til 4. kvadrant.

Spredningsplatemetoden, som vist i Figur 8, er en annen teknikk for dyrking av bakterier. Teknikken ble utført på to måter. Første metode ble utført ved å dyppe en bomullspinne i bakteriekultur. Pinnen ble videre brukt for å spre bakteriene jevnt utover hele agarplaten. Den andre metoden for overføring av bakterier var å tilsette 50  $\mu\text{L}$  av en bakteriekultur på midten av agarplaten. Bakteriekulturen ble spredd jevnt utover hele platen med en bomullspinne for å sørge for at hele platen ble dekket med bakterier.



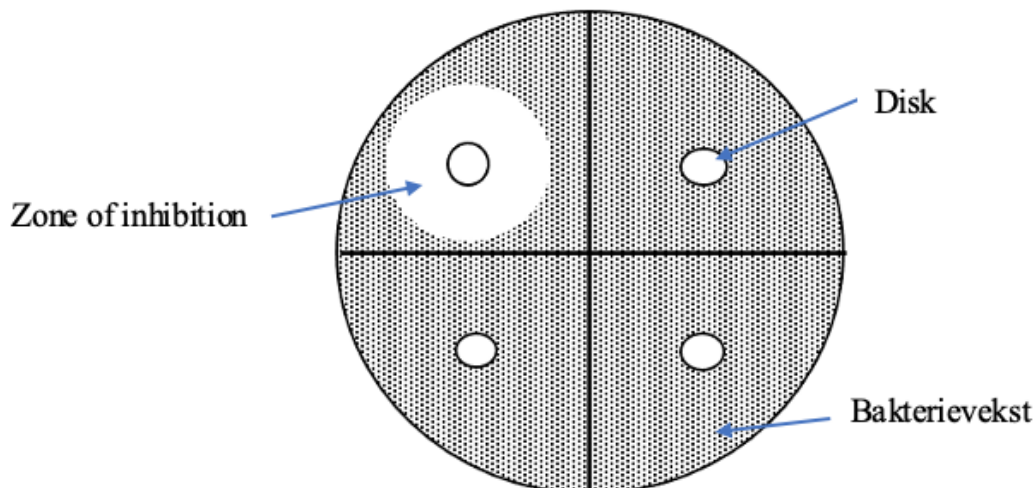
Figur 8 viser hvordan dyrking av bakterier med spredningsplatemetoden utføres (NotesHippo, 2021).

De ulike metodene for utstryk ble brukt til ulike formål i prosjektet. De tre metodene ble først brukt som en opplæring for utstryk av bakterier på agarplater. Deretter ble «quadrant streaking» brukt for å isolere rene kolonier fra lagrede plater med de ulike gramnegative bakteriene. Platene med «quadrant streaking» ble brukt for å lage plater med spredningsplatemetoden ved at én koloni ble plukket fra kvadrant platen, og deretter overført til et rør med M. H. Medium for å lage en bakteriekultur av en bestemt gramnegativ bakterie. Platene med bakterier påstrykt ved spredningsplatemetoden ble brukt for å utføre

diskdiffusjon fordi denne metoden gir en jevn vekst av bakterier som fullstendig dekker agarplaten. En jevn overflate med bakterievekst er fordelaktig for enkel manuell avlesing av resultater ved diskdiffusjon.

## 2.5. Diskdiffusjon

Diskdiffusjon er en enkel metode som går ut på å finne potensielle kandidatforbindelser som hemmer vekst av ulike bakterier. Metoden fungerer som en screeningmetode av testforbindelser. Forbindelser som hemmer bakteriene brukes videre i MicroBroth Dilution for å bestemme den laveste konsentrasjonen av forbindelsene som resulterer i bakteriehemming. Hemming av bakterier i et diskdiffusjonsassay vises ved at det dannes en hemmingssone, kalt «Zone of inhibition», som vist i Figur 9. Sonen forekommer rundt disker med bakteriehemmende forbindelser plassert på agarskåler.



Figur 9 viser design av agarplater i forsøk med diskdiffusjon i dette prosjektet. Figuren illustrerer en hemmingssone dannet av bakteriehemmende forbindelser.

For testing av 18 forbindelser (17 testforbindelser og Ciprofloxacin) på gramnegative bakterier med diskdiffusjon ble M.H agar plater strøket på med *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae* og *K. pneumoniae* bakterier på hver sin agarplate med «quadrant streaking». Platene ble satt til inkubasjon over natten. Hver av de 18 enkelte forbindelsene, med en konsentrasjon på 10 mM, ble fortynnet med Dimetylsulfoksid (DMSO) til 500  $\mu$ M ved å blande 38  $\mu$ L DMSO og 2  $\mu$ L forbindelse. DMSO er et vanlig brukt løsningsmiddel som brukes til blant annet preparering av testforbindelser. DMSO har egenskapen til å minimere kontamineringer ved at middelet har evnen til å drepe bakterier og sopp. De fortynnede forbindelsene ble videre benyttet til preparering av disker. Fire disker for hver forbindelse ble



preparert ved å tilsette 10  $\mu$ L løsning til hver disk. Diskene ble satt til tørk i avtrekksskap i omtrent 2 min.

Suspensjonen av bakteriene ble preparert ved å måle verdien av optisk tetthet (OD) i et spektrofotometer. Suspensjonen ble klargjort ved å tilsette én koloni av hver bakteriestamme til hvert sitt Falconrør med 2 mL M.H medium. Suspensjonene ble blandet ved bruk av en vortex mikser. 1 mL av M.H medium ble tilsatt til en kyvette og ble brukt som blankprøve for å nullstille spektrofotometeret. 1 mL av hver bakteriesuspensjon ble tilsatt til kyvetter. Toppen av kyvettene ble forseglet med parafilm for å unngå kontaminering av miljø og bakteriekultur. For avlesing av OD-verdi ved 600 nm ble kyvettene satt inn i spektrofotometeret. En OD-verdi på 0,068 skulle oppnås. Ved høyere eller lavere OD-verdi enn ønsket ble bakteriesuspensjonen henholdsvis fortynnet eller oppkonsentrert til ønsket verdi. Ved for høy OD-verdi ble bakteriesuspensjonen fortynnet ved at 1 mL M.H medium ble tilsatt til 1 mL bakteriesuspensjon i Falconrørene. Fortynningen ble foretatt fram til ønsket verdi ble oppnådd. Ved lavere OD-verdi ble en ny bakteriesuspensjon laget.

Fem M.H. agar plater for hver bakteriestamme ble preparert for diskdiffusjon ved å dele platene i 4 deler. Hver fjerdedel ble nummerert fra 1 – 18. På den femte platen ble én fjerdedel brukt som kontroll hvor kun bakterier ble strøket på. En ny fjerdedel på samme plate ble brukt til blankprøve hvor hverken bakterier eller disk med forbindelse ble påsatt. Agarplatene ble tilsatt bakterier ved bruk av spredningsplatemetoden. Dette tilsvarer omtrent 50  $\mu$ L bakteriesuspensjon tilsatt på hver plate. Ved første parallell ble en bomullspinne dyppet ned i en bakteriesuspensjon for påstryking av bakterier, mens i andre parallell ble 50  $\mu$ L tilsatt direkte på agarplatene før utstryk med en bomullspinne ble foretatt. De preparerte diskene ble plassert og presset på designerte deler av agarplaten. Platene ble forseglet med parafilm og plassert i plastpose før platene ble satt til inkubasjon over natten ved 37 °C med 5% CO<sub>2</sub>. Ved neste dag ble en manuell avlesning av resultater foretatt.

## 2.6. MicroBroth Dilution

MicroBroth Dilution er en metode som ble brukt for å finne den minste konsentrasjonen av en forbindelse som kreves for å hemme bakterievekst ved ulike eksperimenter. Denne konsentrasjonen av forbindelser kalles for Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

### 2.6.1. MicroBroth Dilution med gramnegative bakterier

De 17 testforbindelsene og Ciprofloxacin, som skulle testes mot *M. tuberculosis*, ble først testet mot *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae* og *K. pneumoniae*. Én bakteriekoloni av én bakteriestamme ble plukket fra tilhørende plate med voksende bakterier lagret i kjøleskap ved 4 °C. Bakteriekolonien ble strøket ut på en M.H agarplate med «quadrant streaking» metoden. Platen ble satt til inkubasjon under normale betingelser over natten. Dette ble utført for å forsikre at bakteriene er ved optimal vekst ved utførelse av eksperimentene.

For å utføre MicroBroth Dilution ble 96-brønners plater med flat bunn brukt. Platene ble plassert horisontalt. Første rad av totalt åtte rader ble brukt for blanke prøver hvor 200 µL M.H medium ble tilsatt. Neste rad ble brukt til kontroll hvor 100 µL vekstmedium og 100 µL bakteriesuspensjon ble tilsatt. Tillaging av bakteriesuspensjon ble utført på lik måte som beskrevet i delkapittel 2.5. I de seks resterende radene ble seks forbindelser testet mot én gramnegativ bakterie. For å oppnå 250 µM konsentrasjon som høyeste konsentrasjon av forbindelsene i forsøket, ble 190 µL M.H. vekstmedium og 10 µL av hver forbindelse tilsatt til første brønn av hver rad. 100 µL vekstmedium ble tilsatt til alle resterende brønner. Første brønn med vekstmedium og forbindelse i hver rad ble godt blandet. Det ble foretatt en seriefortynning hvor 100 µL ble overført en brønn til neste brønn slik at konsentrasjonen av forbindelse i hver brønn ble halvert for hver fortynning. Konsentrasjon av en forbindelse i hver rad ble herved mellom 0,12 µM – 250 µM. For å utføre metoden på 18 forbindelser (inkludert Ciprofloxacin) ble totalt tre 96-brønners plater brukt for hver bakteriestamme.

For én plate ble bakterieløsning tilsvarende  $7 \cdot 10^5$  bakterieceller/mL og 10 mL vekstmedium tilsatt i et reservoar, og blandet. 100 µL bakteriesuspensjon ble overført til alle brønner ekskludert brønnene for blank kontroll. Platene ble satt til inkubasjon over natten ved 37 °C med 5% CO<sub>2</sub>. Manuell avlesning av hemming av bakterievekst ble foretatt ved å identifisere den siste klare brønnen, per rad, med forbindelse uten bakterievekst. Klar brønn, som tilsvarer brønnene for blank kontroll, indikerer for hemming av bakterievekst, mens tåkete, uklare brønner viser bakterievekst. Konsentrasjon av forbindelse i respektive klare brønner vil være MIC verdien av en forbindelse mot en spesifikk bakteriestamme.

### 2.6.2. MABA assay med *M. tuberculosis*

Tre stammer av *M. tuberculosis*, laboratoriestammen H37Rv, #1 med *katG* genmutasjon, og #7 med *inhA* mutasjon, ble hentet ut fra ultrafryser ved -80 °C. De ulike stammene ble strøket på 7H10 plater med 10% OADC ved bruk av «quadrant streaking». Platene ble forseglet med parafilm og satt i inkubator ved 37 °C med 5% CO<sub>2</sub> i 26 dager. Dette ble utført for å sørge for isolering av bakteriekolonier ved optimal vekst.

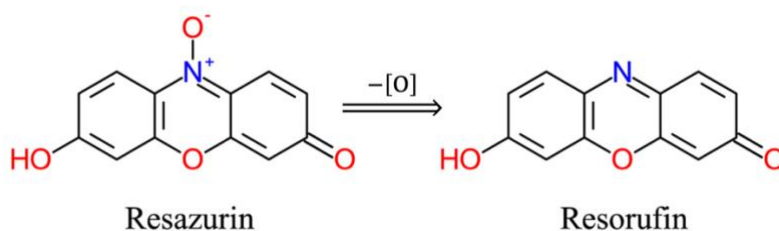
Én isolert bakteriekoloni fra hver MTB stamme ble tilsatt til hvert sitt Falconrør med 10 mL 7H9 medium tilsatt OADC og Tween. Falconrørene ble satt inn i en risteinkubator ved 37 °C. Disse bakteriekulturene kalles for primære bakteriekulturer. Fem dager før arbeid med MTB stammene ble subkulturer fra de primære bakteriekulturene preparert ved å blande 1 mL av primær bakteriekultur med 9 mL 7H9 medium. Subkulturene ble oppbevart på samme måte som primære kulturer.

For å måle hvilke forbindelser som hemmer vekst av MTB ble Microplate Alamar Blue Assay (MABA) utført. MABA assay er et høysensitivt assay som brukes for å kvantifisere virkningen av ulike forbindelser mot MTB, MDR-MTB og XDR-MTB. Assayet involverer MicroBroth Dilution, og denne metoden ble utført med samme prinsipp som utførelse med gramnegative bakterier. De første forsøkene med MTB ble kun utført med H37Rv. Dette ble utført for å velge de best hemmende forbindelsene av 17 testforbindelser for videre forsøk med de resistente stammene av MTB. Dette ble utført på bakgrunn av at det er liten sannsynlighet for at stoffer som er inaktive mot H37Rv er aktive mot muterte MTB stammer. For første screening av 17 testforbindelser og én kontrollforbindelse mot H37Rv ble 96-brønners plater plassert vertikalt. 200 µL vekstmedium ble tilsatt til alle de ytterste brønnene av platene. Videre ble en kontroll foretatt ved å tilsette en rad med 100 µL vekstmedium og 100 µL H37Rv bakteriesuspensjon. Ni forbindelser per plate ble testet mot laboratoriestammen. 196 µL vekstmedium og 4 µL forbindelse ble blandet i første brønn av hver rad for hver forbindelse. Dette tilsvarer en konsentrasjon på 100 µM og 3,125 µM forbindelse i henholdsvis første og siste brønn per rad etter seriefortynning. Når alle effektivt hemmende forbindelser av H37Rv hadde blitt selektert fra første screening ble en kontroll av de selekterte testforbindelsene mot H37Rv utført. Konsentrasjon av testforbindelser mellom 100 µM – 0,04882 µM ble brukt til kontrollutførelsen og til screening mot de klinisk isolerte stammene. Ved utførelsen av disse forsøkene ble utformingen av 96-brønners platene utført på følgende måte: platen ble plassert horisontalt, seks første brønner i første rad ble brukt for

tilsetning av vekstmedium, seks siste brønner i første rad ble brukt for kontroll av bakterievekst, og resterende rader ble brukt for tilsettelse av testforbindelser mot MTB.

MTB bakteriesuspensjon ble preparert ved å blande 1 mL suspensjon fra subkultur og 1 mL vekstmedium i et falconrør. 1 mL av blandingen ble overført til en kyvette og måling av absorbanen ble foretatt ved 600 nm med et spektrofotometer. Total celletetthet i hver brønn var omtrent  $4 \cdot 10^5$  Colony Forming Unit (CFU)/mL. Tilsvarende volum av celler og 10 mL 7H9 medium ble blandet, og 100  $\mu$ L av løsningen ble tilsatt til alle brønner unntatt brønnene for blank kontroll. Platene ble forsegle og inkubert ved 37 °C med 5% CO<sub>2</sub>.

Seks dager senere ble Resazurin salt (aktiv del av Alamar Blue reagens) brukt for å måle hemming av MTB bakterier ved ulike konsentrasjoner av testforbindelsene. Resazurin fargeløsning ble laget ved å løse 7,7 mg Resazurin-salt i 50 mL PBS. Fargeløsning og Tween ble blandet til et 8:5 forhold, og 32,5  $\mu$ L av blandingen ble tilsatt til alle brønner. Platene med fargestoff ble inkubert over natten ved normale betingelser. Det ble foretatt en visuell kontroll av fargeendring i platene etter inkubasjon. Ønskelig fargeendring bør framstå tydelig for å kunne skille mellom brønner med og uten bakterievekst. Brønner uten bakterievekst vil ha en mørk blå farge, brønner med minimal bakterievekst vil være lilla, mens brønner med høy konsentrasjon av bakterier vil være rosa i fargen. Dette skyldes at Resazurin endrer farge fra blå til rosa når forbindelsen blir redusert, som vil si at fargestoffet mister et oksygenatom (Guerin et al., 2001). Resazurin er en fluorescerende indikator som bruker redox reaksjoner for å indikere til bakterievekst i testbrønner. MTB membranen er gjennomtrengelig for fargestoffet. Dette sørger for at enzymet NADPH dehydrogenase, i metabolsk aktive bakterier, kan overføre elektroner fra NADPH + H<sup>+</sup> til Resazurin. Overføringen av elektroner resulterer i reduksjon av Resazurin til Resorufin, som vist i Figur 10, i testbrønner hvor MTB bakterier er aktive. Dersom tydelig fargeendring ble observert ble platene videre preparert for avlesning av fargeintensitet (Costa et al., 2021).



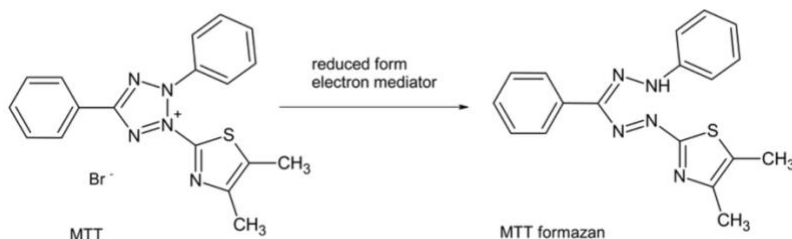
Figur 10 viser reduksjon av Resazurin til Resorufin i bakterieceller (Knapp et al., 2018).

For avlesning av fargeforskjellene ble nye 96-brønners plater som var kompatibel til plateavleser benyttet. 50  $\mu\text{L}$  formaldehyd og 50  $\mu\text{L}$  væske fra brønnene ble tilsatt til en ny plate. Formaldehyd sørger for eliminering av MTB bakterier. Kjemikalet tilsettes for å drepe bakterier i testbrønner slik at måling av fargeintensitet ikke forstyrres. Plateoppsettet ble bevart ved overføring av væske fra brønnene mellom de to ulike 96-brønners platene. Bløtlagt papir med formaldehyd ble lagt på toppen av 96-brønners platene i 20 min for å forsikre at eventuelle bakteriekontamineringer utenfor brønnene elimineres. Platene ble satt inn i en plateavleser og måling av fargeintensitet ble foretatt.

## 2.7. MTT Assay

MTT assay er et cytotoxisk assay som måler forbindelsers evne til å forårsake celledød eller celledød (cytotoxisk aktivitet). Analysen brukes for å teste og observere toksisiteten av nye forbindelser mot humane celler. Ved oppdagelse av nye legemidler er cytotoxiskitet et kritisk punkt for å evaluere effekten av forbindelsene mot humane celler. Stoffer med høye verdier for toksisitet blir eliminert som potensielle legemidler for behandling av sykdommer. Målet med assayet er å bestemme om forbindelsene som dreper infeksjøs mikrober samtidig ikke dreper humane celler (ThermoFisher, u.å.-a).

MTT Assay er et kolorimetrisk assay som bruker tetrazolium salt (MTT) for bestemmelsen av metabolsk aktivitet i levende celler. MTT reduseres til formazan av dehydrogenaser i mitokondriet i aktive celler. Reduksjonen er vist i Figur 11. Formazan er lite vannløselig, og dette resulterer i at formazan danner et kompleks med celler (formazan krystaller). Ved tilsettelse av DMSO vil formazan krystallene løses opp, og en målbar, lilla fargeendring vil forekomme (Benov, 2021) og (Kropf et al., 2010).



Figur 11 viser reduksjon av MTT til formazan (Twarużek et al., 2018).

### 2.7.1. Splitting og behandling av HEK-293 celler med testforbindelser

For utførelse av cytotoxisk assay ble Human Embryonic Kidney (HEK-293) celler brukt. HEK celler ble tatt ut fra nitrogen tank, satt i ultrafryser, og deretter satt på tørris i noen minutter for tining av cellene. Tint celleinnhold og 1 mL forvarmet DMEM medium ble overført til et 15 mL Falconrør og sentrifugert ved 6000 rpm ved 22 °C i 5 minutter. Supernatanten ble separert fra pelleten ved bruk av en vakumpipette, og pelleten ble resuspendert med 3 – 4 mL DMEM medium for å oppløse pelleten. En celleflaske ble fylt med 5 – 6 mL DMEM medium slik at bunnen av flasken ble dekket. Celleløsningen ble overført til flasken, og flasken ble satt til inkubasjon ved 37 °C med 5% CO<sub>2</sub> i tre netter.

Celleflasken med celler ble tatt ut av inkubatoren, og cellenes morfologi ble sjekket under mikroskop for å bekrefte at cellene var festet til bunnen. Ønsket cellemorfologi var elongerte celler. Væsken i flasken ble fjernet ved bruk av en vakumpipette. Det ble tilsatt 2 mL PBS for å vaske cellene og for å fjerne døde celler. Væsken med de døde cellene ble vakumpippetert, og det ble tilsatt 2 mL Trypsin EDTA. Flasken ble ristet forsiktig og satt til inkubasjon ved 37 °C i 3 – 4 minutter for at cellene skulle løsne fra bunnen av flasken. Celleløsningen ble overført til et 15 mL Falconrør, og løsningen ble sentrifugert ved 12 000 rpm i 6 min. Supernatanten ble fjernet, pelleten ble løst opp med 2 mL DMEM medium, og løsningen ble blandet. Cellene ble preparert for celledelling ved å tilsette 10 µL Trypan Blue og 10 µL celler i et eppendorfrør. 10 µL av blandingen ble overført til et tellekammer. Antall celler ble målt for videre fortytning av cellene i DMEM medium slik at en løsning på  $5 \cdot 10^3$  celler i 10 mL DMEM medium kunne lages. Konsentrasjonen og volum av suspensjonen er oppgitt for én plate. 100 µL av celleduspensjon ble tilsatt til hver brønn i 96-brønners plater, og plater ble inkubert over natten. Resterende celler fra oppløst pellet ble overført til en celleflaske og 5 – 6 mL DMEM medium ble tilsatt. Flasken ble satt inkubasjon slik at nedfrysning av cellene kunne fortas på et senere tidspunkt.

Ciprofloxacin og de selekterte testforbindelsene fra MABA assay ble brukt for å foreta en seriefortynning av forbindelsene. Disse forbindelsene ble testet i tre paralleller på en plate hvor det ble brukt fire rader for seriefortynning av tre kolonner til utførelse av parallelle forsøk. Forbindelsene ble preparert til fortytning ved å tilsette 392 µL DMEM medium og 8 µL forbindelse i et eppendorfrør, og 360 µL DMEM medium i tre andre eppendorfrør. Løsningen i det første eppendorfrøret hadde høyest konsentrasjon ved 100 µM. For hver fortytning ble konsentrasjonen 10 ganger mindre. Det vil si etter siste fortytning var

konsentrasjonen av forbindelsen på 0,1  $\mu$ M. Seriefortynningen ble utført ved å overføre 40  $\mu$ L løsning fra røret med høyest konsentrasjon til rørene med lavere konsentrasjon. Seriefortynningen ble utført på samme måte for alle forbindelsene, inkludert Ciprofloxacin. 100  $\mu$ L av de ulike konsentrasjonene fra seriefortynningen ble tilsatt til hver sin rad, i tre paralleller, i 96-brønners platene. Det ble i tillegg satt opp en kontroll uten testforbindelser hvor brønnene kun inneholdt 100  $\mu$ L DMEM medium. Platene ble satt til inkubasjon i 48 timer ved 37 °C.

#### 2.7.2. Tilsettelse av MTT fargereagens

MTT fargeløsning (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromid) med en konsentrasjon på 5 mg/mL ble laget ved å veie 20 mg MTT reagens i et UV beskyttende eppendorfrør. Spesialrør ble brukt for å ta hensyn til lyssensitiviteten av fargereagenset. For å begrense lyseksponering av fargereagens ble lyset i avtrekksskapet slått av når reagenset ble blandet med 40 mL PBS i et 50 mL Falconrør. 96-brønners platene ble tatt ut fra inkubasjon, og mediet i hver brønn ble fjernet. 10  $\mu$ L av reagensløsningen ble tilsatt til hver brønn, og platene ble inkubert for 2 ½ time. Væskeløsningen i brønnene ble fjernet og 100  $\mu$ L av DMSO ble tilsatt for løse opp formazan-krystaller i brønnene. OD-verdien i brønnene ble målt ved 560 nm ved bruk av en plateavleser.

#### 2.7.3. Frysing av HEK-293 celler for oppbevaring

Lagrede HEK celler til nedfrysning fra punkt 2.7.1. ble nedfryst for å lagre cellene til eventuelle framtidige forsøk. 2 – 3 mL Trypsin ble tilsatt i celleflaske med elongerte celler. Flasken ble inkubert i 2 – 3 min, trypsinløsningen ble fjernet, og 5 mL DMEM medium ble tilsatt. 600  $\mu$ L HEK celler løst i DMEM medium ble tilsatt til egnede rør for frysing av celler. Deretter ble 300  $\mu$ L FBS og 100  $\mu$ L DMSO tilsatt til cellene. Rørene ble plassert i en frysebeholder kalt «Mr. Frosty Container» hvor cellene ble fryst ved -80 °C i en ultrafryser. «Mr. Frosty Container» ble brukt for å sørge for at cellene langsomt nedfryses ved en hastighet nærmest -1 °C /min, som er den optimale nedkjølingshastigheten for lagring av humane celler (ThermoFisher, u.å.-d). Neste dag ble cellene satt i nitrogentank for oppbevaring.

## 2.8. Behandling av rådata

Rådata fra MABA Assay og MTT Assay ble analysert ved bruk av GraphPad Prism. I programmet ble en normalisering av resultatene foretatt for beregning av  $IC_{50}$  verdier og generering av grafer.



### 3. Resultater

Effekten av nye testforbindelser mot antibiotikaresistente MTB stammer ble studert i dette prosjektet. 17 testforbindelser og en kontrollforbindelse ble testet mot *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, en referanse-stamme av MTB, og to kliniske isolater av MTB, for å bestemme effekten av testforbindelsene mot bakteriene. Bestemmelsen ble foretatt ved dyrking av bakterier, diskdiffusjon, MicroBroth Dilution og MABA assay. I tillegg ble toksisiteten av testforbindelsene mot HEK-293 celler målt ved bruk av MTT assay. Tabell 2 angir gramnegative bakterier og MTB stammene brukt i forsøk, og mutasjonene som forårsaker resistens hos bakteriene.

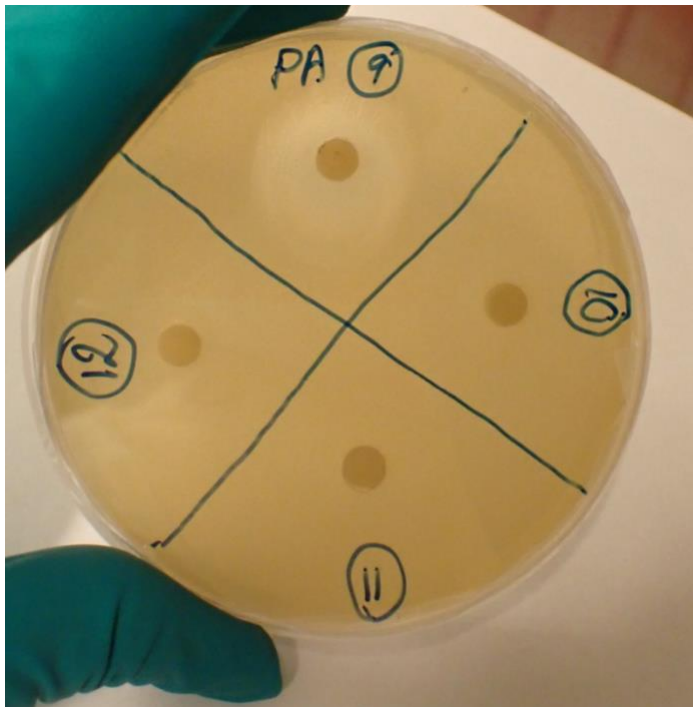
Tabell 2 angir mutasjon og hvilke forbindelser gramnegative bakterier og MTB stammene brukt i prosjektet er resistente mot. Bakteriene med ingen mutasjon eller resistens er gitt med bindestrek.

Bakterie	Mutasjon	Resistens mot
MTB H37Rv	-	-
MTB #1	<i>katG</i>	INH
MTB #7	<i>inhA</i>	INH
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>A. baumannii</i>	-	-
<i>E. cloacae</i>	Ikke bestemt	Ciprofloxacin
<i>K. pneumoniae</i>	Ikke bestemt	Ciprofloxacin

#### 3.1. Generell screening med gramnegative bakterier

Screening med diskdiffusjon ble utført for å finne potensielle kandidatforbindelser som hemmer vekst av *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, og *K. pneumoniae*. Ciprofloxacin og 17 testforbindelser med en konsentrasjon på 500 µM ble screenet mot de ulike bakteriene. Hemming av bakteriene observeres ved dannelsen av «Zone of inhibition» rundt disker behandlet med forbindelsene. Dette er vist i Figur 12. Testforbindelser som resulterte i dannelsen av en hemmingssone på agarplater med ulike bakterier er gitt i Tabell 3. Ved første parallell av diskdiffusjon ble det kun observert én hemmingssone rundt disk behandlet med Ciprofloxacin på plate med *A. baumannii*. Ved andre parallell ble en sone observert rundt disk behandlet med forbindelse 9 på plate med *P. aeruginosa*, i tillegg til at det ble observert en sone rundt disk behandlet med Ciprofloxacin mot både *P. aeruginosa* og *A. baumannii*.

Figur 12 viser « zone of inhibition» dannet på agarplate dyrket med *P. aeruginosa*. Forbindelse 9 som sørger for dannelse av sonen er forbindelse 9.



Tabell 3 viser radiusen (mm) av «zone of inhibition» for hemmende testforbindelser mot *P. aeruginosa* og *A. baumannii*. Forbindelser uten hemming av bakteriene er gitt med bindestrek.

Bakterie	Parallell 1		Parallell 2	
	Forbindelse	Radius (mm)	Forbindelse	Radius (mm)
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	9	12
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	Ciprofloxacin	15
<i>A. baumannii</i>	Ciprofloxacin	11	Ciprofloxacin	13

### 3.2. Effekt av testforbindelser mot gramnegative bakterier

Resultatene fra den generelle screeningen av testforbindelser mot gramnegative bakterier ble brukt i utførelsen av MicroBroth Dilution for å bestemme den minste konsentrasjonen av testforbindelse 9 og Ciprofloxacin som kreves for å hemme veksten av *P. aeruginosa* og *A. baumannii*. Fire avhengige forsøk ble utført. MIC verdiene for parallellene med forbindelsene 9 og Ciprofloxacin, og tilhørende standardavvik, er gitt i Tabell 4. Tabellen viser at testforbindelse 9 var mer aktiv mot *P. aeruginosa* enn mot *A. baumannii*, men er mindre aktiv enn Ciprofloxacin mot både *P. aeruginosa* og *A. baumannii*.

Tabell 4 viser minimum konsentrasjon for hemming av *P. aeruginosa* og *A. baumannii* med testforbindelsene 9 og Ciprofloxacin.

	Forbindelse 9, MIC mot <i>A. baumannii</i> ( $\mu\text{M}$ )	Ciprofloxacin, MIC mot <i>A. baumannii</i> ( $\mu\text{M}$ )	Forbindelse 9, MIC mot <i>P. aeruginosa</i> ( $\mu\text{M}$ )	Ciprofloxacin, MIC mot <i>P. aeruginosa</i> ( $\mu\text{M}$ )
Parallell 1	15,6	0,48	7,8	0,48
Parallell 2	15,6	1,9	3,9	0,24
Parallell 3	31,2	0,48	1,9	0,48
Parallell 4	15,6	0,48	3,9	0,48
Standardavvik	7,8	0,71	2,47	0,12

MicroBroth Dilution ble i tillegg utført med *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, og *K. pneumoniae* mot alle testforbindelser. MIC verdiene for hemmende forbindelser fra screeningen er fremstilt i Tabell 5. Ingen testforbindelser viste hemming av *K. pneumoniae*, mens totalt syv forbindelser viste hemming av *A. baumannii*. To forbindelser var aktive mot *P. aeruginosa* og *E. cloacae*. Forbindelser som ikke er gitt i tabellen er inaktive mot alle fire bakterier.

Tabell 5 viser MIC verdier ( $\mu\text{M}$ ) for ulike hemmende forbindelser mot *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, og *K. pneumoniae*. Bakterier uten hemming av forbindelser gitt i tabellen er markert i tabellen med en bindestrek.

	MIC mot <i>A. baumannii</i> bakterier ( $\mu\text{M}$ )	MIC mot <i>P. aeruginosa</i> bakterier ( $\mu\text{M}$ )	MIC mot <i>E. cloacae</i> bakterier ( $\mu\text{M}$ )	MIC mot <i>K. pneumoniae</i> bakterier ( $\mu\text{M}$ )
Forbindelse 1	15,6	-	-	-
Forbindelse 2	62,5	-	-	-
Forbindelse 4	250	-	15,6	-
Forbindelse 6	62,5	-	-	-
Forbindelse 7	125	-	-	-
Forbindelse 9	15,6	1,9	-	-
Ciprofloxacin	1,9	0,9	250	-

### 3.3. Effekt av testforbindelser mot MTB

MABA assay ble utført for å identifisere hvilke forbindelser som hemmer veksten av MTB. Hemming av bakteriene ble målt med  $IC_{50}$  verdi, som vil si den minste konsentrasjonen av en forbindelse som kreves for 50% hemming av bakteriene. Tre stammer av *M. tuberculosis* ble brukt i assayet. Disse var H37Rv, #1 med *katG* mutasjon, og #7 med *InhA* mutasjon. Stammene ble screenet mot totalt 17 testforbindelser. I tillegg ble Ciprofloxacin brukt som kontrollforbindelse. Konsentrasjonen av testforbindelser og Ciprofloxacin i utførelsen av MABA Assay var mellom 100  $\mu$ M – 0,04882  $\mu$ M.

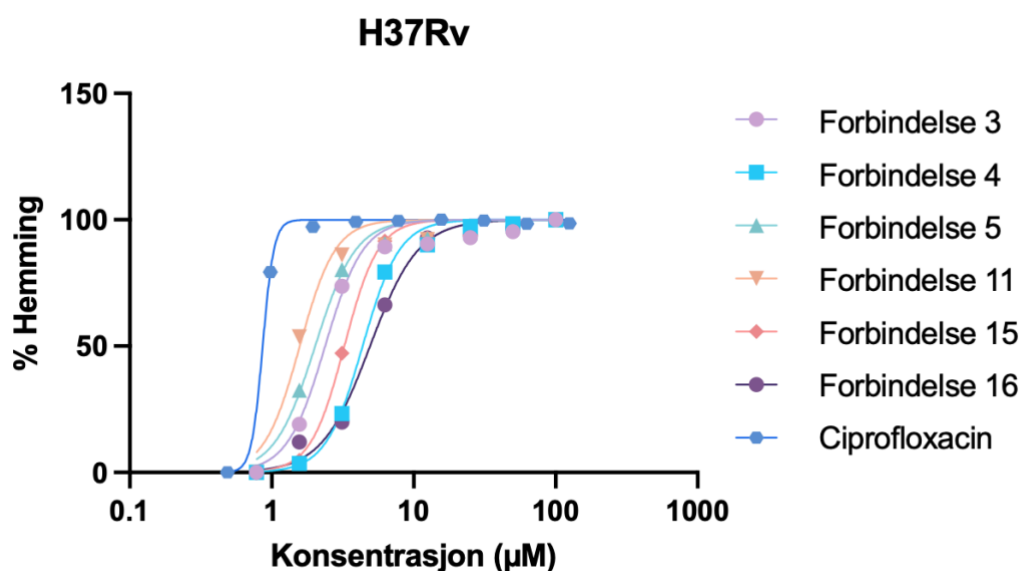
Testforbindelsene og Ciprofloxacin var i første omgang screenet mot H37Rv som en eliminasjonsprosess av forbindelser som er inaktive eller lite hemmende av laboratoriestammen. Dette ble utført grunnet at det er liten sannsynlighet for at stoffer som er inaktive mot H37Rv vil være aktive mot muterte MTB stammer. Forbindelser som var effektivt hemmende av H37Rv ble videre brukt til screening mot muterte stammer. Det ble manuelt observert at forbindelse 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 15 og 16 resulterte i hemming av laboratoriestammen. For forbindelse 1, 6, 9 og 10 ble det observert lav grad av hemming. Det ble i tillegg observert at laboratoriestammen var mer sensitiv til forbindelsene 3, 4, 5, 11, 15 og 16. De mer sensitive forbindelsene ble selektert til screening mot INH-resistent MTB.

De normaliserte  $IC_{50}$  verdiene for selekterte forbindelser som ga hemming mot de ulike stammene av MTB er vist i Tabell 6. Lavere  $IC_{50}$  verdi enn 50  $\mu$ M betraktes som tilstrekkelig for videre testing av forbindelsene i prosessen med oppdagelse av medikamenter. Alle hemmende forbindelser gitt i tabellen har en  $IC_{50}$  verdi lavere enn 50  $\mu$ M. Ciprofloxacin er forbindelsen med lavest  $IC_{50}$  verdi for alle tre stammer. Av testforbindelsene virker forbindelse 11 best mot H37Rv, mens forbindelse 5 virker best mot #1. Forbindelse 3 og 5 virket like godt mot #7.

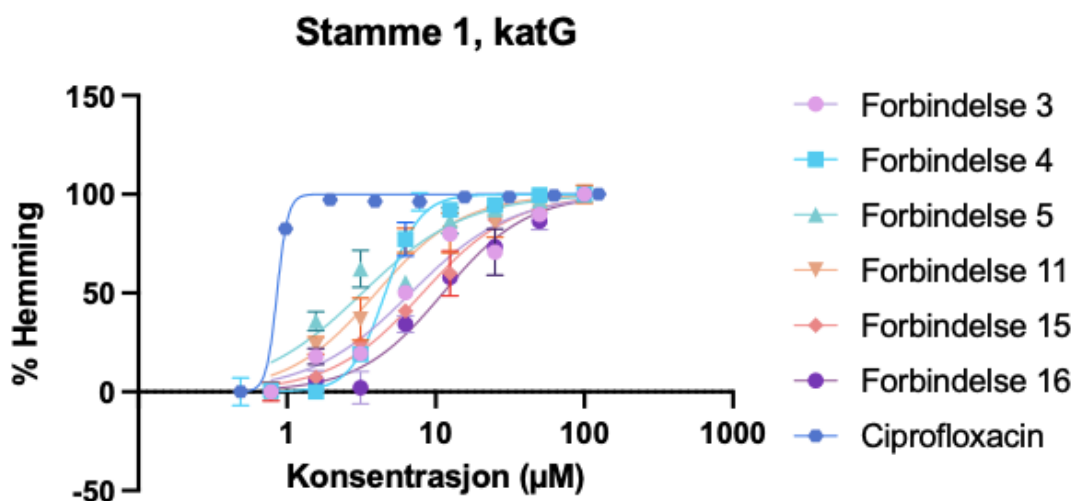
Tabell 6 angir normaliserte IC<sub>50</sub> verdier (μM) av selekterte hemmende forbindelser mot H37Rv og to klinisk isolerte MTB stammer.

Forbindelse Nr.	H37Rv (μM)	#1 (μM)	#7 (μM)
Forbindelse 3	2,378	6,787	1,326
Forbindelse 4	4,366	4,581	5,841
Forbindelse 5	2,023	3,197	1,326
Forbindelse 11	1,576	3,967	7,089
Forbindelse 15	3,247	8,151	1,422
Forbindelse 16	4,925	11,21	2,265
Ciprofloxacin	0,8637	0,8569	0,8466

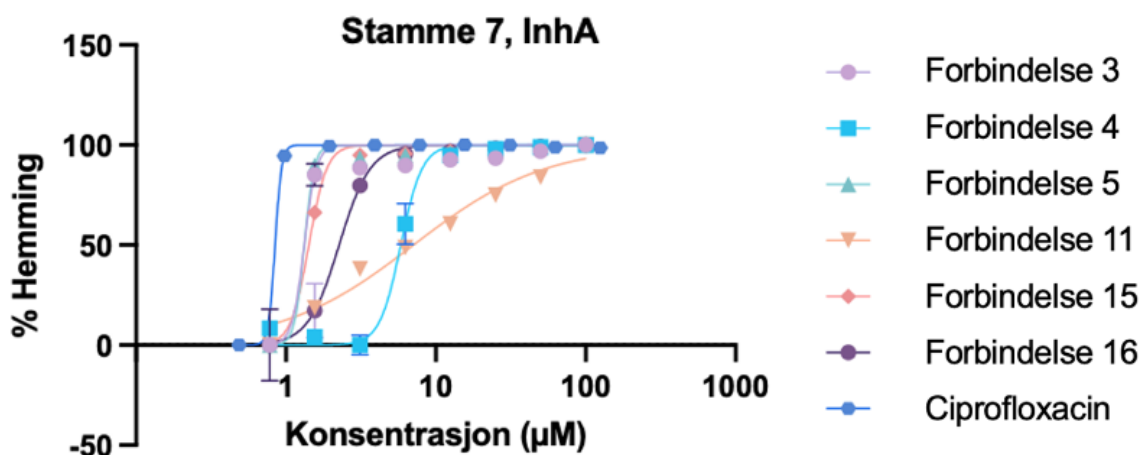
Tabell 5 ble brukt som utgangspunkt for framstillingen av grafer med normaliserte IC<sub>50</sub> verdier. Grafene generert hvor prosent hemming av bakteriene ble plottet mot konsentrasjon av testforbindelsene brukt i screening. Grafene for H37Rv, #1 og #7 er henholdsvis gitt i Figur, 13, 14, og 15.



Figur 13 viser antall prosent (%) hemming av H37Rv plottet mot konsentrasjonen (μM) av de selekterte testforbindelsene.



Figur 14 viser prosent (%) hemming av MTB #1 med KatG-mutasjon, plottet mot konsentrasjonen (µM) av de selekterte testforbindelsene.



Figur 15 viser prosent (%) hemming av MTB #7 med InhA-mutasjon, plottet mot konsentrasjonen (µM) av de selekterte testforbindelsene.

### 3.4. Toksisitet av testforbindelser mot humane celler

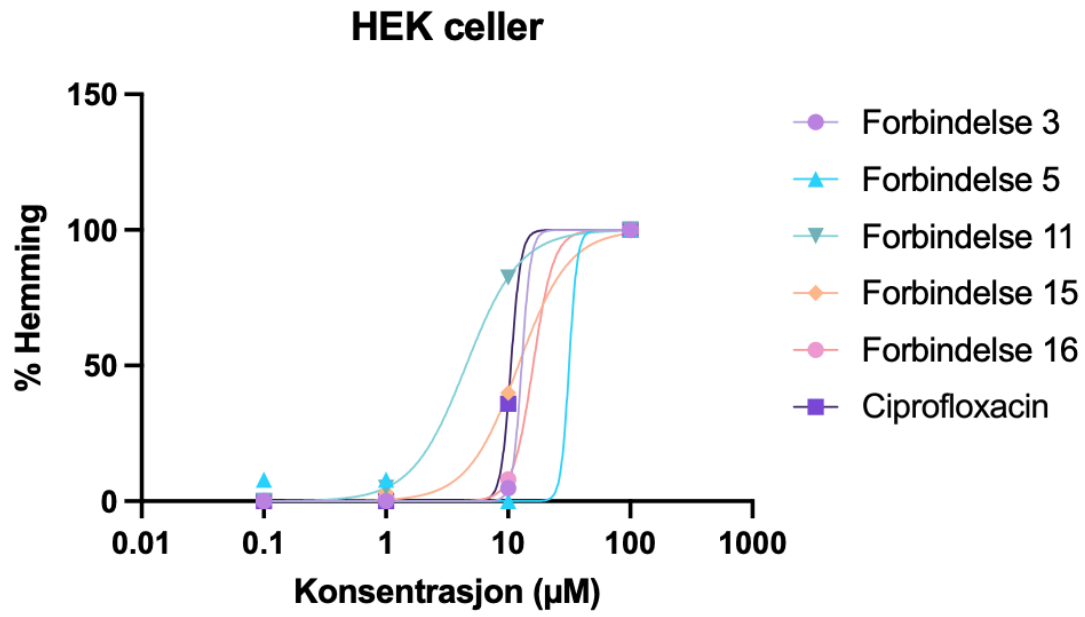
MTT Assay ble utført på HEK-293 celler for å bestemme toksisiteten av selekterte testforbindelser som forårsaket hemming av ulike MTB stammer. Tabell 7 angir forbindelser testet mot HEK celler og tilhørende normaliserte IC<sub>50</sub> verdier. Høy IC<sub>50</sub> verdi indikerer at flere celler er til stede i testbrønnene. Det vil si at konsentrasjoner av forbindelser tilstede i

brønnene ikke resulterer i celledød. IC<sub>50</sub> verdier over 50 µM ansees som tilstrekkelig for bruk av testforbindelser i videre analyse innen prosessen med oppdagelse av nye medikamenter. Tabellen viser at IC<sub>50</sub> verdien for forbindelse 4 er over 100 µM. Ingen andre enn forbindelse 4 har en IC<sub>50</sub> verdi over 50 µM.

Tabell 7 viser IC<sub>50</sub> verdier (µM) for selekterte forbindelser testet mot HEK-293 celler ved bruk av MTT Assay.

Forbindelse	IC <sub>50</sub> Normalisert (µM)
3	12,92
4	> 100
5	41,62
11	4,532
15	12,12
16	16,02
Ciprofloxacin	10,56

IC<sub>50</sub> verdiene ble automatisk kalkulert ved bruk av GraphPad Prism. For minimering av forstyrrelser i kalkulering av IC<sub>50</sub> verdier av forbindelser mot HEK-293 celler, ble normalisering av rådata for testforbindelse 4 utelatt. Dette ble utført for å unngå følgefeil og falske resultater ved normalisering av rådata og autogenerering av IC<sub>50</sub> verdier. Uten utelatelse av rådata for forbindelse 4 ble det generert IC<sub>50</sub> verdier som ikke samsvarte med utførte visuelle observasjoner. Dette resulterer i utelatelsen av forbindelse 4 i grafen angitt i Figur 16. Figuren viser prosentvis hemming av HEK celler ved ulike konsentrasjoner av Ciprofloxacin og selekterte testforbindelser.



Figur 16 angir en visuell framstilling av prosentvis (%) hemming av HEK celler ved behandling med ulike testforbindelser ved konsentrasjoner mellom 0,1 – 100 µM.



## 4. Diskusjon

### 4.1. Diskdiffusjon med gramnegative bakterier

Ved å utføre diskdiffusjon med *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, og *K. pneumoniae*, ble det observert «zone of inhibition» for forbindelse 9 for *P. aeruginosa*, og Ciprofloxacin for både *P. aeruginosa* og *A. baumannii*. Radiusen for sonen ble målt til 12 mm for *P. aeruginosa* med forbindelse 9, og 15 mm og 13 mm for henholdsvis *P. aeruginosa* og *A. baumannii* med Ciprofloxacin. Disse forbindelsene ble selektert for å utføre MicroBroth Dilution med *P. aeruginosa* og *A. baumannii* for å bestemme MIC verdier av forbindelsene. Ut i fra diskdiffusjon forventes det ikke hemming av testforbindelse 9 mot *A. baumannii*. Ved utførelsen av MicroBroth Dilution ble det likevel observert hemming av *A. baumannii* mot forbindelse 9. Dette indikerer til at generell screening med diskdiffusjon ikke har fanget opp aktiviteten av forbindelse 9 mot bakterien. For å forsikre at alle aktive forbindelser mot de fire bakterietypene identifiseres ble MicroBroth Dilution utført med alle 18 forbindelser, inkludert Ciprofloxacin.

Resultatene for begge MicroBroth analysene er gitt i Tabell 4 og 5. Resultatene for analysene indikerer til at diskdiffusjon ikke er en meget presis metode for å selektere forbindelser til screening av de gramnegative bakteriene. Det ble observert hemming med ytterligere fem testforbindelser (forbindelse 1, 2, 4, 6 og 7) mot de ulike gramnegative bakteriene enn det som ble oppnådd ved diskdiffusjon. En viktig grunn til observasjonen er forskjellen i konsentrasjon av testforbindelser brukt i metodene. Ved diskdiffusjon ble 10 µL av 500 µM forbindelser brukt, mens ved MicroBroth Dilution var høyeste konsentrasjon ved 250 µM. Metodene har ulik hensikt i den forstand at diskdiffusjon er en generell metode for å eliminere inaktive og lite aktive forbindelser mot bakteriene, mens MicroBroth Dilution er en mer sensitiv screeningsmetode. Dermed vil sistnevnte metode være mer sensitiv ovenfor lavere konsentrasjoner av testforbindelser enn diskdiffusjon. MicroBroth Dilution bør derfor brukes som en kontroll for å fange opp andre aktive forbindelser mot bakteriene som eventuelt ikke har blitt fanget opp ved diskdiffusjon.

Det kan være ulike grunner til at diskdiffusjon er en mer generell metode enn MicroBroth Dilution. Løseligheten av forbindelsene kan ha en innflytelse på hvorvidt forbindelsene diffunderer fra disk til bakterielt miljø på agarplatene. For å fastslå om løseligheten av forbindelsene har en påvirkning på hemmingen av bakteriell vekst på agarplater kan videre

analyser og testing utføres. Generelt vil tungtløselige forbindelser ha ulik tilgjengelighet til bakterier i flytende og faste medier. Effekten av interaksjon mellom testforbindelser og bakterier kan være større i flytende medier enn på disker. I diskdiffusjon tilsettes forbindelsene på disker før de plasseres på agarplater, mens i MicroBroth Dilution er forbindelser og bakterier direkte tilsatt i flytende medium. Det resulterer i mer kontakt mellom bakterier og forbindelser, og dette kan bidra til effektiv hemming av bakterier med MicroBroth Dilution sammenliknet med diskdiffusjon.

Ved første parallell av diskdiffusjon ble det gjort feil under preparering av diskene ved at det var enkelte tilfeller hvor det var vanskelig å separere to disker fra hverandre. Vanskeligheten ved separering kan ha ført til at ulik mengde forbindelse har blitt absorbert av diskene. Det kan ha resultert i disker med lavere volum av testforbindelser enn 10 µL, som videre kan ha hatt en virkning på diffusjon av forbindelser. Feilen ble korrigert til utførelse av neste parallell. Her ble det observert hemming av *P. aeruginosa* med forbindelse 9 og Ciprofloxacin, i tillegg til hemming av *A. baumannii* med Ciprofloxacin, som observert ved parallell 1. Observasjon av hemming av *P. aeruginosa* i parallell 2 indikerer til at feilpreparering av disker kan ha hatt en betydelig effekt på diffusjon av forbindelser på agarplatene. En annen faktor som bidrar til observasjonen, er at spredningsplatemetoden ble benyttet for å tilsette bakterier til agarplater. Ved første parallell ble en bomullspinne dyppet ned i bakteriesuspensjon før påstrykning av bakterier, mens ved andre parallell ble 50 µL tilsatt med pipette og deretter spred utover med en bomullspinne. Tilsetning av unøyaktig volum av bakterier ved første parallell kan ha resultert i påstrykning av større mengde bakterier enn ønsket.

Ved senere forsøk kan det være fordelaktig med bruk av MicroBroth Dilution for både generell screening av testforbindelser mot bakterier, i tillegg til bestemmelsen av MIC verdier i samme forsøk. Dette kan potensielt øke effektiviteten av testprosessen ved å unngå bruken av diskdiffusjon for generell screening, og deretter bruken av MicroBroth Dilution mot alle forbindelser for bekreftelsen av aktive og inaktive forbindelser.

#### 4.2. Ciprofloxacin-resistens hos *E. cloacae*

*E. cloacae* brukt i prosjektet har tidligere gjennomgått fenotypisk bestemmelse hvor resistens mot Ciprofloxacin har blitt undersøkt. Ved bruk av MicroBroth Dilution ble MIC av

forbindelse 4 og Ciprofloxacin mot *E. cloacae* bestemt til å henholdsvis være 15,6  $\mu\text{M}$  og 250  $\mu\text{M}$ . Lav MIC kreves for hemming av bakterievekst. Dette gjelder fordi toksiske effekter av forbindelser mot humane celler vil være minst mulig ved lavere konsentrasjon av medikamenter brukt i behandling. For å minimere toksisiteten av Ciprofloxacin bør ikke konsentrasjoner høyere enn 50  $\mu\text{M}$  brukes. I følge U.S. Food and Drug Administration (FDA) er 750 mg Ciprofloxacin tabletter en av de høyeste doseringene som brukes ved behandling av blant annet bakterieinfeksjoner. Dette tilsvarer en maksimal konsentrasjon på 12,98  $\mu\text{M}$  (4,3  $\mu\text{g/mL}$ ) per tablett. Dermed bør ikke konsentrasjonen av Ciprofloxacin mot bakterieinfeksjoner overstige 12,98  $\mu\text{M}$ . I vårt forsøk ble konsentrasjon av Ciprofloxacin på 250  $\mu\text{M}$  observert for bakteriehemming, men på grunn av at store konsentrasjoner av forbindelsen ikke brukes i behandling mot bakteriestammen, kan det likevel tolkes til at stammen er en resistent stamme. Resistensen av Ciprofloxacin i *E. cloacae* gjelder dermed for lavere konsentrasjoner enn 250  $\mu\text{M}$  av forbindelsen. Dermed kan hemming av Ciprofloxacin mot *E. cloacae* måles ved bruk av en Ciprofloxacin resistent bakteriestamme (FDA, 2005) og (NCBI, 2022).

### 4.3. Effekten av inkubasjonstid i MABA Assay

I MABA Assay ble det i første omgang screenet 17 testforbindelser og en kontrollforbindelse mot H37Rv. Dette ble utført for å velge de best hemmende forbindelsene av 17 testforbindelser for videre forsøk med de resistente MTB stammene. Dette ble utført på bakgrunn av at det er liten sannsynlighet for at stoffer som er inaktive mot H37Rv er aktive mot muterte MTB stammer. Det ble manuelt observert at forbindelse 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 15 og 16 resulterte i hemming av laboriestammen. For forbindelse 1, 6, 9 og 10 ble det observert lav grad av hemming. Det vil si at hemmingen av H37Rv kun ble observert ved høye konsentrasjoner av forbindelsene. Derimot ble det observert at laboriestammen var mer sensitiv til forbindelse 3, 4, 5, 11, 15 og 16. Dette betyr at bakterievekst av H37Rv ble hemmet ved lav konsentrasjon av testforbindelser. Lav konsentrasjon av testforbindelser (< 50 $\mu\text{M}$  IC<sub>50</sub> verdi) er ønskelig fordi det resulterer i hemming av bakterier samtidig som toksisiteten av forbindelser i mennesker minimeres. Dermed ble forbindelse 3, 4, 5, 11, 15 og 16 videre selektert for screening mot klinisk isolerte MTB stammer med INH resistens.

Screening med testforbindelser mot #1 og #7 ga uidentifiserbare resultater ved både avhengige og uavhengige replikater. Ideelt ønskes det plater med tydelig skille mellom

bakterievekst og bakterie hemming ved at fargeintensiteten i brønnene er enten tydelig blå (bakteriehemming) eller tydelig rosa (bakterievekst). Platene med uidentifiserbare resultater ble det hovedsakelig observert brønner med blå og lilla farge. Det indikerer til at bakteriene ikke har hatt tilstrekkelig tid til god vekst. For å oppnå identifiserbare resultater med INH-resistent MTB medførte dette til endring av inkubasjonstid fra syv til 14 dager. Ved å forlenge inkubasjonstiden vil bakteriene ha lenger tid til å vokse. Generelt er MTB langsomt voksende bakterier. Ved vekst av stammer med mutasjoner kan inkubasjonstid dermed ha en betydelig påvirkning til vekst. Etter 14 dager inkubasjon ble identifiserbare resultater oppnådd. Disse er gitt i Tabell 6, og viser at forbindelse 5 er mest effektiv for hemming av #1, mens både forbindelse 3 og 5 er like effektive mot hemming av #7.

#### 4.4. Interferens mellom fargestoff og testforbindelser

Interferens mellom Resazurin og testforbindelsene ble observert i utførelsen av MABA-testen. Tydelig hemming ble observert ved brønner med lav konsentrasjon ved at fargeløsningen var blå. Ved alle brønner med høyere konsentrasjon av testforbindelser bør det være hemming, og dermed blå fargeløsning. Men i noen brønner hvor det teoretisk skulle forekommet blå farge ble det observert lys lilla eller mørk lilla farge. Dette forekom ved fire replikater. Ved bruk av assayet forventes det avtagelse i farge fra blå til rosa, ved testbrønner i nærheten av brønn med MIC av forbindelse. Brønn med MIC skal være den siste brønnen med blåfarge. Dette ble oppnådd ved forsøkene. Det ble derimot observert lilla farge ved høy konsentrasjon, blå farge ved noe lavere konsentrasjoner fram til og med MIC, og rosa farge ved brønner med bakteriell vekst etter MIC brønn. Observasjonen muliggjør dermed bestemmelsen av MIC ved at det er tydelig skille mellom testbrønn med MIC og første brønn med bakterievekst.

Forekomsten av lys/mørk lilla farge var ikke uniform for alle testforbindelser. Enkelte forbindelser ga klar blåfarge ved alle konsentrasjoner fram til og med MIC, som indikerer til lite/ingen interferens mellom fargestoff og forbindelse. Noen forbindelser viste endring fra blå til lilla farge ved høye konsentrasjoner, mens andre viste interferens ved lavere konsentrasjoner. Interferensen kan skyldes tilstedeværelsen av eventuelle kjemiske funksjonelle grupper, som tioler, aminer, amider, og karboksylsyrer. I en studie publisert i 2018 kom det fram at små molekyler kan interagere med fargeløsninger i både MABA og MTT assay i fravær av celler. Dette kan forklare observasjonen om at interferens mellom

forbindelser og fargestoff ikke ble observert ved brønner uten bakteriell hemming. Observasjonen bør videre testes for å inkludere mengde interferens i beregning av  $IC_{50}$  verdier ved bruk av GraphPad Prism. Interferens kan bestemmes eksempelvis ved utførelse av MABA assay i forsøk med identiske parametere og uten tilværelsen av bakterier (Neufeld et al., 2018).

#### 4.5. Usikkerhet knyttet til MTT assay

Resultatene fra MTT assay er vist i Tabell 7. Resultatene er gitt som  $IC_{50}$  verdier og viser toksisiteten av testforbindelsene mot HEK celler.  $IC_{50}$  verdi angir mengde levende celler som er til stede i testbrønnene. En høy  $IC_{50}$  verdi indikerer derfor til høy konsentrasjon av celler i testbrønner, mens lav verdi indikerer at cellene blir drept av testforbindelsene. Med dette i betraktning ble det tolket til at forbindelse 4 er tryggest av både testforbindelsene og kontrollforbindelsen mot HEK celler. Dette kan begrunnes med at  $IC_{50}$  verdien er over 100  $\mu\text{M}$ , og forbindelsen dermed har lav toksisitet mot HEK celler. Ingen av de andre selekterte testforbindelsene hadde en  $IC_{50}$  verdi over 50  $\mu\text{M}$ .

På annen side er usikkerheten av resultatene store som følge av flere feilkilder. Det ble observert moderate mengder HEK celler fjernet under nest siste trinn i MTT assayet. Flere formazan-krystaller ble fjernet når fargereagensen ble fjernet fra brønnene. Dette kan ha hatt stor betydning for kalkuleringen av  $IC_{50}$  verdier for toksisitetsbestemmelsen. Ved tilsetning og fjerning av fargeløsning ble det foretatt visuelle kontroller ved bruk av mikroskop for å forsikre at cellene var festet til bunnen av brønnene. Feilkildene oppstod ved fjerning av fargeløsning, som ble utført ved bruk av pipette. Vakuemet/trykket som oppstod førte til at formazan-krystaller løsnet fra bunnen av brønnene. Dette medførte videre til at en ujevn mengde celler fjernet fra ulike brønner, som dermed førte til ulike konsentrasjoner av HEK celler i testbrønnene. Ved tilsettelsen av DMSO vil det forekomme en fargeendring som kan måles for bestemmelsen av  $IC_{50}$  verdier. Ved fjerning av ujevn mengde celler fra testbrønner vil fargeendringen korrespondere tapet av krystaller, og det oppstår dermed stor usikkerhet i kalkulering av  $IC_{50}$  verdier.

For å forhindre fjerningen av formazan-krystaller med MTT-fargeløsning bør 96-brønners platene behandles med et belegg, eksempelvis med Poly-L-lysin, før tilsettelsen av celler (Muller, 2014). Poly-L-lysin er et uspesifikt stoff som bidrar til celleadhesjon til faster flater.

Elektrostatisk interaksjon mellom anioner på bakteriell cellemembran og behandlet flate vil sørge for celleadhesjon (Merck, u.å.-c). Videre kan prosedyren endres slik at MTT reagens ikke fjernes før tilsetning av DMSO (Sapet, 2014). Ved slik prosedyre vil det unngås tap av formazan-krystaller ved at steget med store feilkilder elimineres. Generelt kan konsekvent pipetteringsteknikk brukes slik at mest mulig MTT reagens fjernes uten forstyrrelse av formazan-krystaller.

Beregningen av usikkerhet og standardavvik ble ikke foretatt ved kalkulering av  $IC_{50}$ . Dette skyldes at assayet ikke ble repetert ved avhengige eller uavhengige forsøk. Dette fører til begrensninger og stor usikkerhet for bestemmelse av toksisiteten. Størrelsen av feilkildene og fraværet av replikater bidrar til at konklusjoner om toksisiteten mot HEK celler ikke kan avgjøres med god nok sikkerhet. Dermed kreves videre testing av forbindelsene for å trekke gyldige konklusjoner om toksisiteten av testforbindelsene mot HEK-293 celler.

## 5. Konklusjon

Hensikten med prosjektet er å teste nye forbindelser mot antibiotikaresistent tuberkulose. I første omgang ble testforbindelsene testet mot de gramnegative bakteriene *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* og *Klebsiella pneumoniae* med diskdiffusjon. Forbindelse 9 hemmet *A. baumannii*, og Ciprofloxacin hemmet både *A. baumannii* og *P. aeruginosa*. I tillegg ble MicroBroth Dilution utført mot bakteriene, og metoden førte til at flere forbindelser hemmet flere gramnegative bakterier enn hemmingen som ble observert ved diskdiffusjon. Hemming av bakteriene med forbindelsene med minst konsentrasjon (MIC) ble regnet som den beste. Det ble observert at Ciprofloxacin ga best hemming av *A. baumannii* og *P. Aeruginosa*. Av testforbindelsene ga forbindelse 1 og 9 best hemming av *A. baumannii*, mens forbindelse 9 ga best hemming av *P. Aeruginosa*. For *E. cloacae* ble bakterien best hemmet av forbindelse 4, mens for *K. pneumoniae* ble det derimot ikke observert hemming ved noen av forbindelsene. Med resultatene for MicroBroth Dilution i betraktning kan det i tillegg konkluderes at metoden er en bedre egent metode for screening av testforbindelser enn diskdiffusjon.

MABA-assay ble utført for å påvise de forbindelsene som hemmer veksten av MTB. Lavere IC<sub>50</sub> verdi enn 50 µL ble betraktet som tilstrekkelig for videre testing med forbindelsene. Ut i fra resultatet for denne analysen ble det observert at Ciprofloxacin ga best hemming av vekst mot alle tre MTB stammer. Av testforbindelsene hadde forbindelse 11 best hemming av H37Rv med en IC<sub>50</sub> verdi på 1,576 µM. Forbindelse 5 med en IC<sub>50</sub> verdi på 3,197 µM ga best hemming av stammen med *KatG* mutasjon. Stammen med *InhA* mutasjon ble best hemmet av forbindelse 3 og 5 hvor IC<sub>50</sub> verdien var på 1,326 µM. I MABA-Assayet ble det observert en interferens mellom Resazurin og testforbindelser. Interferensen hadde ikke en påvirkning i bestemmelse av IC<sub>50</sub> verdier, men effekten av interferens bør videre testes separat for å bestemme størrelsen som interferensen har på fargeintensiteten i MABA Assay.

MTT analyse ble foretatt for å undersøke toksisiteten i testforbindelsene mot HEK-293 celler. I analysen regnes testforbindelser med høy IC<sub>50</sub> verdi som tryggest. Forbindelsen med høyest IC<sub>50</sub> verdi var forbindelse 4 hvor verdien var over 100 µM. Forbindelse 4 ble dermed i utgangspunktet tolket som den tryggeste forbindelsen av testforbindelsene mot HEK celler. Men på grunn av størrelsen av feilkildene og usikkerheten i forsøket, og fraværet av replikater er det ikke mulig å trekke gyldige konklusjoner om toksisiteten av forbindelsene.

Samlet sett er Ciprofloxacin den beste forbindelsen til eliminering av INH-resistent MTB. Av testforbindelsene ga forbindelse 3, 4, 5, 11, 15 og 16 tilstrekkelig hemming av bakterievekst ved at forbindelsene hadde en IC<sub>50</sub> verdi lavere enn 50 µM. Av de nye testforbindelsene virket forbindelse 11 best mot laboriestedstammen, forbindelse 5 regnes som best mot MTB #1 med *KatG* mutasjon, og forbindelsene 3 og 5 virker best mot *InhA* mutert stamme. Disse forbindelsene mot henholdsvis H37Rv, #1 og #7 har lavest IC<sub>50</sub> av alle testforbindelser mot MTB stammer brukt i prosjektet. Med resultatene i betraktning kan det konkluderes med at hensikten med prosjektet er oppnådd. Men for å få et klart bilde over hvilke forbindelser som både dreper MTB bakteriene og samtidig er trygg mot humane celler kreves det videre testing av testforbindelsene mot humane cellelinjer.



## 6. Referanseliste

- Aarnes, H. (2018, 25.02.2021). *mikrobiom*. Store Norske Leksikon. Hentet 03.05 fra <https://snl.no/mikrobiom>
- Arnesen, T. M. (2014, 28.08.2019). *Fakta om tuberkulose*. FHI. Hentet 07.03 fra <https://www.fhi.no/sv/smittsomme-sykdommer/tuberkulose/tuberkulose---faktaark/>
- Arnesen, T. M., Berild, J. D., Heldal, E. & Mengshoel, A. T. (2021). *Tuberkulose i Norge 2019 og 2020*. Folkehelseinstituttet. <https://www.fhi.no/publ/2021/tuberkulose-i-norge-2019-og-2020---med-behandlingsresultater-for-2018-og-20/>
- Avantor-vwr. (u.å.). *Difco™ Middlebrook 7H9 Broth, BD Diagnostics*. avantor-vwr. Hentet 03.03 fra <https://us.vwr.com/store/product/20787366/difcotm-middlebrook-7h9-broth-bd>
- Bathula, S. R. & Rakhimol, A. (2017). Global Trends in Biorisk Management. *BioRisk*, 12, 1-23. <https://doi.org/10.3897/biorisk.12.12156>
- BD. (u.å.-a, 07.2012). *BD Middlebrook 7H10 Agar*. Becton, Dickinson and Company. Hentet 20.04. fra <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9004>
- BD. (u.å.-b). *Middlebrook 7H9 Broth*. Becton, Dickinson and Company. Hentet 06.03. fra [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/212352.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/212352.pdf)
- Benov, L. (2021). Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT Assay. *Microbiology spectrum*, 9(3), e0163721-e0163721. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01637-21>
- Blondeau, J. M. (2004). Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*, 49(2, Supplement 2), S73-S78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.01.005>
- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 5(2), 279-313. <https://doi.org/10.1093/clinids/5.2.279>
- CDC. (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. I. Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health.
- CDC. (2019, 13.11.2019). *Acinetobacter in Healthcare Settings*. Centers for Disease Control and Prevention. Hentet 26.02 fra <https://www.cdc.gov/hai/organisms/acinetobacter.html>
- CDC. (u.å.-a, 13.12.2021). *About Antibiotic Resistance*. Centers for Disease Control and Prevention. Hentet 09.Mai fra <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html#:~:text=Antibiotic%20resistance%20happens%20when%20germs,in%20the%20U.S.%20each%20year.>
- CDC. (u.å.-b). *Recognizing the Biosafety Levels*. Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health. Hentet 10.05 fra <https://www.cdc.gov/training/quicklearns/biosafety/>

- Costa, P., Gomes, A. T. P. C., Braz, M., Pereira, C. & Almeida, A. (2021). Application of the Resazurin Cell Viability Assay to Monitor Escherichia coli and Salmonella Typhimurium Inactivation Mediated by Phages. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(8), 974.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10080974>
- Dusthacker, A., Balasubramanian, M., Shanmugam, G., Priya, S., Nirmal, C. R., Sam Ebenezer, R., Balasubramanian, A., Mondal, R. K., Thiruvankadam, K., Hemanth Kumar, A. K., Ramachandran, G. & Subbian, S. (2019). Differential Culturability of Mycobacterium tuberculosis in Culture-Negative Sputum of Patients With Pulmonary Tuberculosis and in a Simulated Model of Dormancy. *Frontiers in microbiology*, 10.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02381>
- FDA. (2005). *CIPRO (ciprofloxacin hydrochloride) TABLETS*. US Food and Drug Administration. Hentet 22.05. fra <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Cipro--Approved-Dosing-for-Children-%28label-approved-5-18-2005%29.pdf>
- FHI. (2010a). 08. *Diagnostikk av tuberkulose*. Folkehelseinstituttet. Hentet 15.03 fra <https://www.fhi.no/nettpub/tuberkuloseveilederen/utredning-og-behandling/08.-diagnostikk-av-klinisk-tuberkul/>
- FHI. (2010b, 11.08.2021). *Behandling av tuberkulose*. Folkehelseinstituttet. Hentet 17.04. fra <https://www.fhi.no/nettpub/tuberkuloseveilederen/utredning-og-behandling/behandling-av-tuberkulose/#referanser>
- FHI. (2010c, 25.12.2018). *Pseudomonasinfeksjon - veileder for helsepersonell*. Folkehelseinstituttet. Hentet 19.03. fra <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pseudomonasinfeksjon---veileder-for/>
- FHI. (2013, 21.03.2022). *Land med høy og særlig høy forekomst av tuberkulose*. Folkehelseinstituttet. Hentet 11.05 fra <https://www.fhi.no/sv/smittsomme-sykdommer/tuberkulose/land-med-hoy-forekomst-av-tuberkulo/>
- Fookes, C. (2018). *Quinolones*. Drugs.com. Hentet 11.05 fra <https://www.drugs.com/drug-class/quinolones.html>
- Guerin, T. F., Mondido, M., McClenn, B. & Peasley, B. (2001). Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. *Letters in applied Microbiology*.  
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.2001.00916.x>
- Harper, R. (2019). *Tuberculosis mutation discovery could lead to better treatments*. Drug Target Review. Hentet 07.03 fra <https://www.drugtargetreview.com/news/48591/tuberculosis-mutation-discovery-could-lead-to-better-treatments/>

- HelseNorge. (u.å., 11.07.2019). *Tuberkulose*. HelseNorge. Hentet 04.05 fra <https://www.helsenorge.no/sykdom/lunger-og-luftveier/tuberkulose/>
- Jnawali, H. N. & Ryoo, S. (2013). First– and Second–Line Drugs and Drug Resistance. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/54960>
- Knapp, J. L. A., González-Pinzón, R. & Haggerty, R. (2018). The Resazurin-Resorufin System: Insights From a Decade of “Smart” Tracer Development for Hydrologic Applications. *Water Resources Research An AGU Journal*, 54(9). <https://doi.org/https://doi.org/10.1029/2018WR023103>
- Knoll, K. E., Lindeque, Z., Adeniji, A. A., Oosthuizen, C. B., Lall, N. & Loots, D. T. (2021). Elucidating the Antimycobacterial Mechanism of Action of Ciprofloxacin Using Metabolomics. *Microorganisms*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061158>
- Kropf, P., Kadolsky, U. D., Rogers, M., Cloke, T. E. & Müller, I. (2010). 13 - The Leishmaniasis Model. I D. Kabelitz & S. H. E. Kaufmann (Red.), *Methods in Microbiology* (Bd. 37, s. 307-328). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(10\)37013-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0580-9517(10)37013-9)
- LHL. (u.å.). *Resistent tuberkulose*. LHL Internasjonl. Hentet 10.05 fra <https://www.lhl.no/lhl-internasjonl/temasider/resistent-tuberkulose/>
- LifeClean-International. (u.å.). *LifeClean Disinfectant – high-level surface disinfection*. LifeClean International AB. Hentet 12.01 fra <https://www.lifeclean.se/en/surface-disinfection/lifeclean-disinfectant/>
- Merck. (u.å.-a). *Middlebrook OADC Growth Supplement*. Merck. Hentet 03.03 fra <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sial/m0678>
- Merck. (u.å.-b). *Mueller Hinton Broth 2*. Merck. Hentet 10.01 fra <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sial/90922>
- Merck. (u.å.-c). *Poly-L-Lysine Cell Attachment Protocol*. Merck. Hentet 15.05 fra <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/3d-cell-culture/poly-lysine-product>
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539-539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Muller, P. A. J. (2014). *Formazan crystals problem*. Hentet 15.05 fra <https://www.researchgate.net/post/Formazan-crystals-problem/530b432fcf57d7c9798b4586/citation/download>
- Myrvang, B. (2009). desinfeksjon. I *Store Norske Leksikon*. Hentet 10.05.2022 fra <https://sml.sn.no/desinfeksjon>

- NCBI. (2022). *PubChem Compound Summary for CID 2764, Ciprofloxacin*. National Center for Biotechnology Information. Hentet 13.05 fra <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>
- Neufeld, B. H., Tapia, J. B., Lutzke, A. & Reynolds, M. M. (2018). Small Molecule Interferences in Resazurin and MTT-Based Metabolic Assays in the Absence of Cells. *Anal Chem*, *90*(11), 6867-6876. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01043>
- NHI. (u.å.-a, 18.02.2021). *Behandling av tuberkulose*. NHI. Hentet 05.03. fra <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/tuberkulose/tuberkulose-behandling/?page=all>
- NHI. (u.å.-b, 09.05.2022). *Latent tuberkulose*. Norsk Helseinformatikk. Hentet 18.05. fra <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/tuberkulose/tuberkulose-latent/?page=all>
- NotesHippo. (2021). *Spread Plate Method for Isolation of Bacteria*. NotesHippo. Hentet 21.05. fra
- O'Toole, R. F. & Gautam, S. S. (2017). Limitations of the Mycobacterium tuberculosis reference genome H37Rv in the detection of virulence-related loci. *Genomics*, *109*(5), 471-474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.07.004>
- Ollinger, J., Bailey, M. A., Moraski, G. C., Casey, A., Florio, S., Alling, T., Miller, M. J. & Parish, T. (2013). A dual read-out assay to evaluate the potency of compounds active against Mycobacterium tuberculosis. *PloS one*, *8*(4), e60531-e60531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060531>
- Rahim, M. K. A., Buyong, M. R., Jamaludin, N. M. A., Hamzah, A. A., Siow, K. S. & Majlis, B. Y. (2018, 15-17 Aug. 2018). Characterization of Permittivity and Conductivity for ESKAPE Pathogens Detection. 2018 IEEE International Conference on Semiconductor Electronics (ICSE),
- Ramirez, D. & Giron, M. (u.å., 30.06.2021). *Enterobacter Infections*. StatPearls Publishing. Hentet 09.05 fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559296/>
- Rollag, H., Müller, F. & Tønjum, T. (2019). *Medisinsk mikrobiologi* (Bd. 4). Gyldendal.
- Sapet, C. (2014). *Formazan crystals problem*. Hentet 15.05 fra <https://www.researchgate.net/post/Formazan-crystals-problem/53106a9ad11b8b00418b4639/citation/download>
- Sebastian, J., Nair, R. R., Swaminath, S. & Ajitkumar, P. (2020). Mycobacterium tuberculosis Cells Surviving in the Continued Presence of Bactericidal Concentrations of Rifampicin in vitro Develop Negatively Charged Thickened Capsular Outer Layer That Restricts Permeability to the Antibiotic. *Frontiers in microbiology*, *11*, 554795-554795. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.554795>
- Sigma-Aldrich. (u.å.-a). *Penicillin-Streptomycin*. Merck. Hentet 25.03. fra <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/p4333>

- Sigma-Aldrich. (u.å.-b). *TWEEN 20*. Sigma-Aldrich. Hentet 03.03 fra <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/217/731/p5927pis.pdf>
- Sirevåg, R. (2009). Klebsiella. I *Store Norske Leksikon*. Store Norske Leksikon. Hentet 17.03.2022 fra <https://sml.snl.no/Klebsiella>
- SML. (2009). sterilisering (mikrobiologi). I *Store Norske Leksikon*. Store Medisinske Leksikon. Hentet 10.05.2022 fra <https://sml.snl.no/sterilisering - mikrobiologi>
- Song, E. H., Shang, J. & Ratner, D. M. (2012). 9.08 - Polysaccharides. I K. Matyjaszewski & M. Möller (Red.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (s. 137-155). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00246-6>
- ThermoFisher. (u.å.-a). *Cytotoxicity Assays*. ThermoFisher Scientific. Hentet 10.05 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cytotoxicity.html>
- ThermoFisher. (u.å.-b). *DMEM, high glucose*. ThermoFisher Scientific. Hentet 10.05 fra <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11965084>
- ThermoFisher. (u.å.-c). *Fetal Bovine Serum (FBS)*. ThermoFisher Scientific. Hentet 10.05 fra [https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs.html?ef\\_id=Cj0KCQjwmuiTBhDoARIsAPiv6L8KovyWzuum9TIOzt0gLKv0wusJrUC1Kih1YctuufYSbNI61oE1mlaAqLYEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!414347351731!p!!g!!bovine%20fetal%20serum&cid=bid\\_clb\\_fbs\\_r01\\_co\\_cp0000\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw\\_nt\\_pur\\_con&gclid=Cj0KCQjwmuiTBhDoARIsAPiv6L8KovyWzuum9TIOzt0gLKv0wusJrUC1Kih1YctuufYSbNI61oE1mlaAqLYEALw\\_wcB](https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs.html?ef_id=Cj0KCQjwmuiTBhDoARIsAPiv6L8KovyWzuum9TIOzt0gLKv0wusJrUC1Kih1YctuufYSbNI61oE1mlaAqLYEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!414347351731!p!!g!!bovine%20fetal%20serum&cid=bid_clb_fbs_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con&gclid=Cj0KCQjwmuiTBhDoARIsAPiv6L8KovyWzuum9TIOzt0gLKv0wusJrUC1Kih1YctuufYSbNI61oE1mlaAqLYEALw_wcB)
- ThermoFisher. (u.å.-d). *Mr. Frosty™ Freezing Container*. ThermoFisher Scientific. Hentet 10.05 fra [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5100-0001?fbclid=IwAROCuadTZwxJDY8\\_PcG7Mqi\\_w7F7JVYF5uywc2\\_tRiM57qXYUi2cK-6T1fE](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5100-0001?fbclid=IwAROCuadTZwxJDY8_PcG7Mqi_w7F7JVYF5uywc2_tRiM57qXYUi2cK-6T1fE)
- ThermoFisher. (u.å.-e). *Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)*. ThermoFisher Scientific. Hentet 25.03 fra <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15140122>
- ThermoFisher. (u.å.-f). *Storing Bacterial Samples for Optimal Viability*. ThermoFisher Scientific. Hentet 10.05 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/microbiology/microbiology-learning-center/storing-bacterial-samples-optimal-viability.html>
- Tønjum, T. (2009, 30.08.2021). *Normalflora*. Store Norske Leksikon. Hentet 09.mai fra <https://sml.snl.no/normalflora>

- Twarużek, M., Zastempowska, E., Soszczyńska, E. & Altyn, I. (2018). The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Folia Biologica et Oecologica*.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1515/fobio-2017-0006>
- WHO. (2012). Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual. I. World Health Organization.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241504638>
- WHO. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. World Health Organization. Hentet 20.04 fra <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- WHO. (2020). *Antibiotic resistance*. WHO. Hentet 12.Mars fra <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antibiotic-resistance>
- WHO. (2021a). *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021*. World Health Organization.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
- WHO. (2021b). *Tuberculosis*. Hentet 07.03 fra <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/tuberculosis>
- Zhang, Y.-J., Li, S., Gan, R.-Y., Zhou, T., Xu, D.-P. & Li, H.-B. (2015). Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4).  
<https://doi.org/10.3390/ijms16047493>

## 7. Vedlegg

### 7.1. Vedlegg 1 – Materialer

Vedlegget gir informasjon om utstyr, kjemikalier, cellelinje og bakterier brukt i utførelsen av prosjektet.

#### 7.1.1. Utstysliste

- Autoklav: matachana S1000
- Analysevekt: Sartorius TE64
- Disker: GE Healthcare LifeSciences Whatman™ Grade AA DISCS 6 mm
- Avtrekksskap i BSL 2 lab: Mars Safety Class 2 SCANLAF
- Spektrofotometer i BSL 2: lab Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 40
- Sentrifuge BSL 1 lab: VWR Mini Star siluerline
- Vortex mikser: Vortex Genie, Scientific Industries G560E
- Kyvette: Polystyrene 10 × 4 × 45 mm, Sarstedt AG&Co
- Integra Pipetboy
- Pipetter:
  - Thermo Scientific Finnpiette® F1 5-50 µL
  - Thermo Scientific Finnpiette® F1 100-1000 µL
  - Thermo Scientific Finnpiette® F1 20-200 µL
  - Thermo Scientific Finnpiette® F1 10-100 µL
  - Thermo Scientific Finnpiette® F2 0,2-2 µL
  - Thermo Scientific Finnpiette® F2 2-20 µL
- 96-brønners plater: Cell culture Plate, 96-Well, Non-treated, with lid, flat bottom, eppendorf
- Ultrafryser: New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U535 innova
- Inkubator: Forma Scientific CO<sub>2</sub> Water jacked incubator
- Risteinkubator i BSL 3 lab: innova 4000 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific
- Spektrofotometer i BSL 3 lab: Genesys 20, Thermo Scientific
- Avtrekksskap i BSL 3 lab: SafeFast Premium 209 class II A1/A2 Microbiological Safety Cabinets, FASTER
- Plateavleser i BSL 3 lab: Victor Nivo Multimode Microplate Reader, PerkinElmer
- ViewPlate-96 Black, Optically Clear Bottom, Tissue Culture Treated, Sterile, 96-Well with lid, PerkinElmer

- Sentrifuge i cellelab: Centrifuge 5810 R, eppendorf
- Mikroskop: Vert.A1 AXIO, Zeiss
- Tellekammer: BIORAD TC20™ Automated Cell Counter
- Plateavleser i cellelab: Thermo Scientific Varioskan LUX Microplate Reader
- Mr.Frosty™ Freezing Container, ThermoFisher Scientific
- Varmeskap: Termaks

#### 7.1.2. Kjemikalier/løsninger

- Antibac Overflate Desinfeksjon 75%
- LifeClean, 0,02% ClO<sub>2</sub>, LifeClean International AB
- 7H9 Medium: Difco™ Middlebrook 7H9 Broth, Becton, Dickinson and Company
- Mueller Hinton Medium 2: Mueller Hinton Broth 2 for microbiology, Cation-adjusted, Sigma-Aldrich
- DMEM medium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose, Sigma-Aldrich
- Mueller Hinton Agarpulver: Mueller-Hinton Agar 2 for microbiology, Sigma-Aldrich
- Glycerol for molecular biology ≥ 99% C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> 92,09 g/mol, Sigma Life Science
- 7H10 Agar: Difco™ Middlebrook 7H10 Agar, ferdigkjøpt fra Becton, Dickinson and Company
- OADC: BBL™ Middlebrook OADC Enrichment, Becton, Dickinson and Company
- Tween® 80- for molecular biology, Sigma-Aldrich
- Fetal Bovine Serum non-USA origin, sterile-filtered, suitable for cell culture, Sigma-Aldrich
- Gibco™ Penicillin-Streptomycin, 10 000 U/mL penicillin og 10 000 µg/mL streptomycin i 10 mM sitrat buffer
- Forbindelse 1-17: testforbindelsene er fra samarbeidspartnere til Genomdynamikk gruppen ved Universitetet i Oslo og Oslo universitetssykehus
- DMSO: Dimethyl sulfoxide for molecular biology ≥ 99,5% C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS 78,13 g/mol, Sigma-Aldrich
- Resazurin sodium salt: C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>NNaO<sub>4</sub>, 251,17 g/mol, Sigma-Aldrich
- PBS – løsning: PreMixed PBS Buffer, 10X, Sigma-Aldrich
- Formaldehyd: CH<sub>2</sub>O 30,031 g/mol, Sigma-Aldrich
- Trypsin EDTA: 0,05% Trypsin 0,02% EDTA (1X), Thermofisher



- Trypan Blue – powder, Bioragent, suitable for cell culture,  $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$  960,81 g/mol, Sigma-Aldrich
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromid),  $C_{18}H_{16}BrN_5S$ , 414,32 g/mol, Sigma-Aldrich

#### 7.1.3. Cellelinje og bakterier

- *Acinetobacter baumannii*, klinisk isolert stamme hentet fra biobanken til Enhet for Genomdynamikk ved UiO og OUS
- *Pseudomonas aeruginosa*, klinisk isolert stamme hentet fra biobanken til Enhet for Genomdynamikk ved UiO og OUS
- *Enterobacter cloacae* med Ciprofloxacin resistens, klinisk isolert stamme hentet fra biobanken til Enhet for Genomdynamikk ved UiO og OUS
- *Klebsiella pneumoniae* med Ciprofloxacin resistens, klinisk isolert stamme hentet fra biobanken til Enhet for Genomdynamikk ved UiO og OUS
- *Mycobacterium tuberculosis*
  - o H37Rv, Enhet for Genomdynamikk ved UiO og OUS
  - o Stamme 1 med *KatG* mutasjon, klinisk isolert MTB stamme hentet fra biobanken til Enhet for Genomdynamikk ved UiO og OUS
  - o Stamme 7 med *InhA* mutasjon, klinisk isolert MTB stamme hentet fra biobanken til Enhet for Genomdynamikk ved UiO og OUS
- HEK-293 cellelinje, American Type Culture Collection (ATCC)

#### 7.1.4. Programmer

- GraphPad Prism, Version 9.3.1, GraphPad Software Inc
- Skanlt Software 6.0.2 Research Edition, Thermo Scientific
- Victor Nivo Control Software Version 4.0.7, PerkinElmer