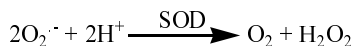


Ispitivanje superoksid dismutazne i antibakterijske aktivnosti kompleksa bacitracina sa prelaznim metalima

Superoksid dismutaze (SOD) su klasa enzima koja je zadužena za prevenciju neželjenih efekata oksidativnog stresa, na taj način što superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) prevode u vodonik peroksid. Poremećaji u funkciji ovih enzima vode nizu patoloških stanja, te je potraga za molekulima koji bi imali SOD aktivnost jedan od prioriteta današnjih farmaceutskih kompanija. Bacitracin (bA) je makrociklični antibiotik za koji je već duže poznato da ima visok afinitet za jone prelaznih metala. U ovom radu je ispitivana SOD aktivnost metaloantibiotičkih kompleksa bacitracina sa prelaznim metalima u zavisnosti od metalnog jona, a takođe je upoređivano njihovo antibakterijsko dejstvo sa samim antibiotikom. Kao joni metala korišćeni su Fe(III), Mn(II), Cu(II) i Ni(II) i rezultati ukazuju da svi kompleksi pokazuju SOD aktivnost, od čega kompleksi Fe(III) i Mn(II) najveću. Kompleks Mn(II) pokazao je i katalaznu aktivnost, tj. sposobnost da nastali vodonik peroksid dalje razgradi. Poređenjem antibakterijske aktivnosti kompleksa sa samim bacitracinom pokazano je da kompleks Mn(II) pokazuje značajno veće antibiotsko dejstvo. Ovi rezultati otvaraju vrata jednom novom pravcu ispitivanja metalnih kompleksa makrocikličnih antibiotika i njihove primene u suprimiranju oksidativnog stresa, ali i pojačavanju antibakterijskog dejstva.

Uvod

Superoksid dismutaze (SOD) su za život neophodna klasa enzima čija je primarna uloga da katalizuju disproporcionisanje superoksid anjon radikala u kiseonik i vodonik peroksid (Halliwell i Gutteridge 1999):



Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) nastaje kao sporedni proizvod u normalnom aerobnom metabolizmu (Halliwell i Gutteridge, 1999), a njegova produkcija može biti povećana u raznim patološkim stanjima (Cuzzocrea *et al.* 2001). Zbog patoloških efekata prekomerne količine $O_2^{\cdot-}$ veoma je važno ispitati mehanizme uklanjanja ovog radikala pomoću jedinjenja sa SOD aktivnošću.

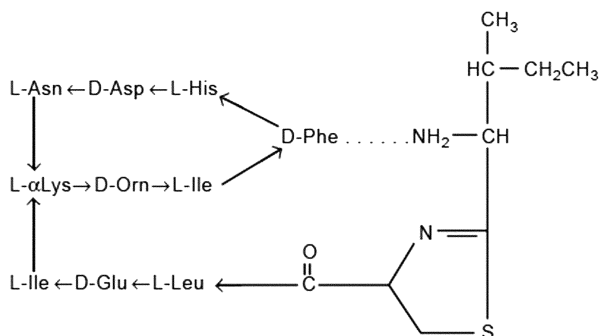
Vladimir Prokopović
(1988), Leskovac,
Voždova 33, učenik
4. razreda Gimnazije
Leskovac

MENTOR:
mr Miloš Filipović,
Hemijski fakultet u

Primena prirodne SOD sve više nailazi na ograničenja, pre svega zbog pojedinih imunoloških problema koje sam molekul izaziva, ali i zbog nemogućnosti prolaska kroz membransku barijeru, što limitira transport molekula SOD do željenog intraćelijskog cilja (Salvemini *et al.* 2002). Zbog toga se u poslednje vreme veliki broj istraživanja okreće ka pronalazenju molekula, mimetika, koji bi imali ulogu SOD, a opet mogli da lako prođu membransku barijeru (Riley 1999).

Mimetici su molekuli niskomolekulske mase, najčešće neorganski kompleksi mangana, gvožđa i cinka, čija je fiziološka uloga identična ulozi superoksid dismutaze. Racionalnim dizajnom pojedinih klasa mimetika, danas se došlo do predstavnika sa katalitičkom konstantom koja je veća od enzimske (Riley 1999).

Jedan od skoro definisanih mimetika jeste i kompleks bacitracina (slika 1) sa divalentnim jonima prelaznih metala (Piacham *et al.* 2006). Bacitracin je dodekapeptidni antibiotik koji sintetiše bakterija *Bacillus sp* (Ming i Epperson. 2002). Ovaj antibiotik efektivan je protiv gram pozitivnih bakterija zbog svoje sposobnosti da inhibira sintezu ćelijskog zida. Posebno je značajan jer je pokazano da može da inhibira i određene stadijume reprodukcije HIVa. Samo mali broj bakterija je rezistentan na ovaj antibiotik, što otvara nove vidike u primenljivosti bacitracina (Mandel *et al.* 1993; Ryser *et al.* 1994).



Slika 1.
Bacitracin A

Figure 1.
Bacitracin A

Jedna od osnovnih hemijskih karakteristika ovog antibiotika jeste veoma veliki afinitet za kompleksiranje sa divalentnim jonima prelaznih metala kao što su Zn(II), Cu(II), Ni(II), Co(II) i Mn(II) (Garbut *et al.* 1961). U ranijim istraživanjima (Piacham *et al.* 2006) dokazano je da neki od ovih kompleksa mogu imati SOD aktivnost i da ih proteaza ne može razgraditi, te ovi kompleksi mogu služiti kao osnova za dalje razvijanje novih terapijskih SOD mimetika. U svetlu ovih činjenica, cilj našeg istraživanja bio je da se ispita SOD aktivnost metaloantibiotičkih kompleksa bacitracina sa prelaznim metalima u zavisnosti od metalnog jona, kao i da se uporedi njihovo antibakterijsko dejstvo sa samim antibiotikom.

Materijal i metode

Sinteza kompleksa. U 150 mL metanola dodato je 1.31 g bacitracina. Napravljeni su i 0.045 M metanolni rastvori soli sledećih metala: NiCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 i MnCl_2 . 20 mL metanolnog rastvora svake soli ukapavano je u rastvor bacitracina tokom jednog sata. Po završetku sinteze metanol je uparavan na vakuum uparivaču da bi se dobio prah metaloantibiotičkih kompleksa Ni(II) -bacitracina, Fe(III) -bacitracina, Cu(II) -bacitracina i Mn(II) -bacitracina.

Snimljeni su UV-VIS i IR spektri bacitracina i dobijenih kompleksa.

Određivanje SOD aktivnosti pomoću NBT-a. SOD aktivnost kompleksa određivana je modifikovanim nitroplavo tetrazolijum (NBT) esejem (Liu *et al.* 2007). U rastvor kompleksa u kalijum fosfatnom puferu pH 7.4 (KPi) rastvoren je NBT, a onda je u rastvor dodat čvrsti KO_2 , tako da mu koncentracija bude bar u desetostrukom višku u odnosu na koncentraciju kompleksa. Formiranje formazana iz nitroplavotetrazolijuma praćeno je spektrofotometrijski na 560 nm (Liu *et al.* 2007).

Određivanje SOD i katalazne aktivnosti merenjem vodonik peroksida. SOD aktivnost određivana je i preko formiranja vodonik peroksida. Rastvori kompleksa u KPi su tretirani desetostrukim viškom KO_2 i nakon pet minuta određivana je koncentracija nastalog vodonik peroksida. Katalazna aktivnost kompleksa je određivana tako što su rastvori kompleksa inkubirani sa petostrukim viškom vodonik peroksida i nakon pet minuta merena je koncentracija H_2O_2 . Koncentracija vodonik peroksida je merena standardnom metodom koja se bazira na spektrofotometrijskoj detekciji proizvoda nastalog u reakciji vodonik peroksida sa peroksidazom iz rena i 4-aminantipirinom (Filipovic *et al.* 2007).

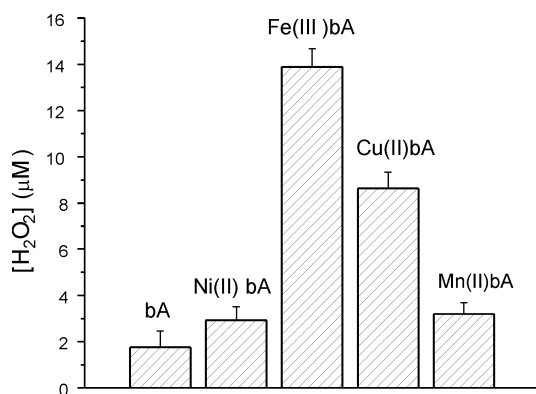
Antibiogram test sintetisanih kompleksa. *Staphylococcus aureus* je zasejan preko noći u tečnom medijumu koji je sadržao 30 g triptonu, 20 g glukoze i 10 g ekstrakta kvasca. Posle 24 sata po 200 μL bakterija je pre-sejano u devet Petri šolja na čvrstu podlogu (agar-agar). Napravljeni su 10 mM rastvori bacitracina i sva četiri kompleksa u 96% etanolu. U svakoj od Petri šolja sa zasejanom kulturom napravljeno je po četiri udubljenja. U svako udubljene jedne Petri šolje sipano je 10, 20, 30 ili 50 μL rastvora bacitracina ili kompleksa. Kao kontrola korišćen je soj bakterija koji je tretiran sa 10, 20, 30 ili 50 μL čistog etanola. Ovako tretirane bakterije ostavljene su 24 sata u termostatu na 37°C.

Rezultati i diskusija

Kompleksi bacitracina sa Ni(II) , Fe(III) , Cu(II) i Mn(II) sintetisani su i prinos u odnosu na teorijski bio je kod Ni(II) -bacitracina 77%, Fe(III) -bacitracina 87%, Cu(II) -bacitracina 80%, a kod Mn(II) -bacitracina 87%. Svi kompleksi pokazuju jasno različit spektar u UV oblasti u odnosu na

sam bacitracin, a kompleksi Fe(III), Cu(II) i Ni(II) apsorbuju i u vidljivom delu. Izostanak specifične apsorpcije kompleksa mangana u vidljivom delu karakterističan je za većinu kompleksa mangana koji imaju SOD aktivnost. IR spektri takođe potvrđuju da je došlo do vezivanja metalnog jona za bacitracin i da je sinteza kompleksa uspešno obavljena.

Da bismo utvrdili SOD aktivnost, vodeni rastvori kompleksa tretirani su viškom kalijum superoksida, kao donora superoksid anjon radikala u prisustvu detektujućeg agensa, nitroplavo tetrazolijuma (NBT). NBT u reakciji sa O_2^- prelazi u plavo obojeni formazan. Kompleksi koji pokazuju SOD aktivnost inhibiraju formiranje plavog formazana, a koncentracija koja izaziva 50% inhibicije se označava kao IC_{50} i koristi za poređenje sa drugim mimeticima. Svi kompleksi pokazali su značajnu SOD aktivnost kao što je dato u tabeli 1. Kompleks Fe(III) pokazuje najveću aktivnost, dok je kompleks Ni(II) najslabiji.

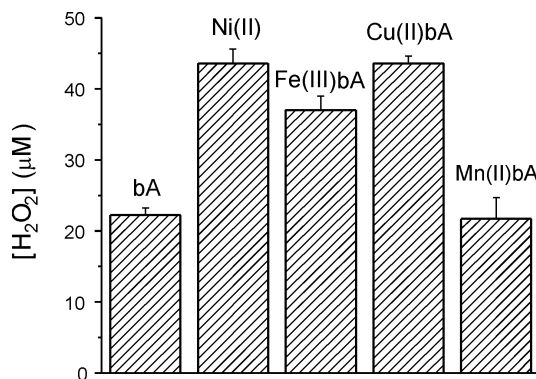


Slika 2.

SOD aktivnost kompleksa i bacitracina merena na osnovu produkcije vodonik peroksida. U rastvore koji su sadržavali 20 μM kompleks ili bacitracin u 50 mM KPi dodavan je čvrst KO₂ tako da ga finalno bude u višestrukom višku i nakon pet minuta merena koncentracija nastalog vodonik peroksida i poređena sa kontrolnim uzorkom u kome nije bilo kompleksa.

Figure 2.

SOD activity of the complexes and bacitracin determined via production of hydrogen peroxide. Solid KO₂ was added to 20 μM complex/bacitracin solution in 50 mM KPi buffer to final concentration of 200 μM. After five minutes the concentration of formed hydrogen peroxide was determined and compared to control sample which contained no complex or bacitracine.



Slika 3.

Katalazna aktivnost kompleksa i bacitracina. U 10 μM rastvor kompleksa dodavan je vodonik peroksid (finalno 50 μM) i merena njegova koncentracija nakon pet minuta

Figure 3.

Catalatic activity of the complexes and bacitacin. Hydrogen peroxide was added to 10 μM complex solution (finally 50 μM) and its concentration was measured after five minutes of incubation at room temperature.

Tabela 1. IC₅₀ vrednosti dobijene na osnovu NBT esejja za određivanje SOD aktivnosti kompleksa

Kompleks	IC ₅₀ [μM]
bA	0
Ni(II)-bA	17.3±0.3
Fe(III)-bA	14.2±0.3
Cu(II)-bA	16±0.3
Mn(II)-bA	15.7±0.2

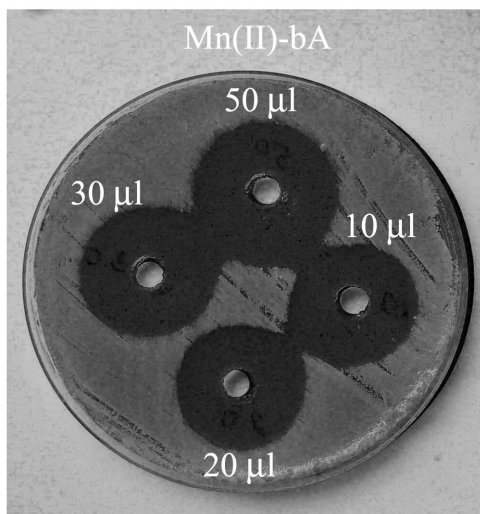
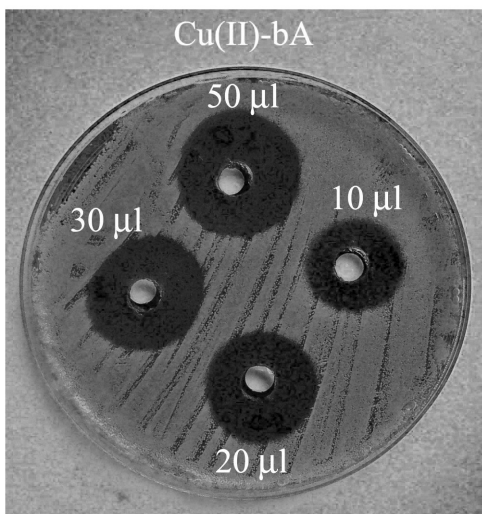
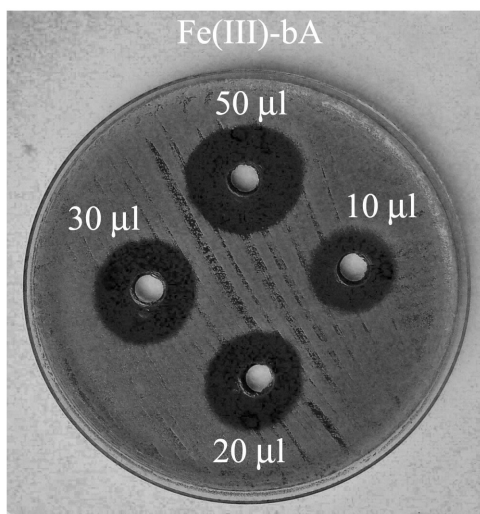
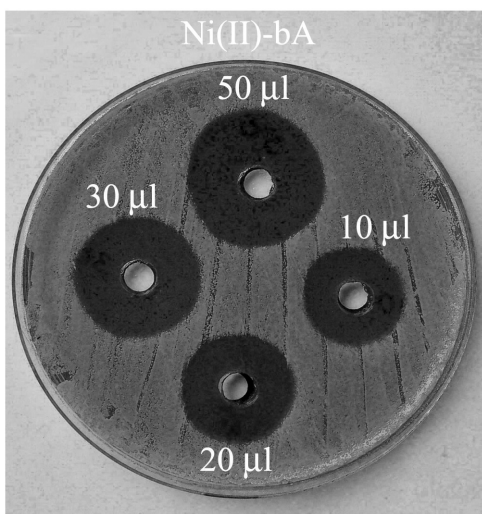
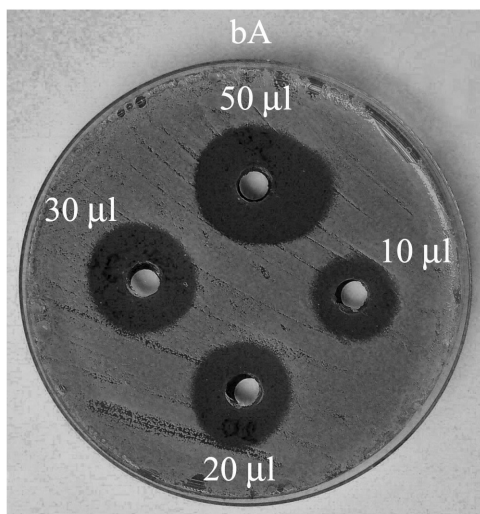
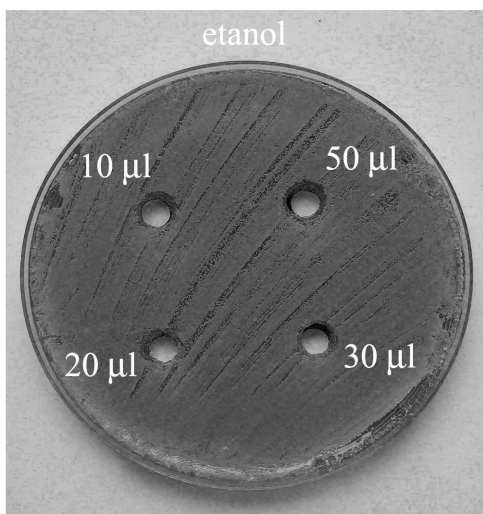
U reakciji superoksid anjon radikala sa vodom dolazi do njegove spontane dismutacije u vodonik peroksid i kiseonik. Prisustvo mimetika bi ubrzalo ovaj proces i povećalo procenat nastalog vodonik peroksida. Slika 2 jasno pokazuje da svi kompleksi povećavaju prinos dobijenog vodonik peroksida, pri čemu su ponovo najefikasniji kompleksi Fe(III) i Cu(II), dok su kompleksi Ni(II) i Mn(II) nešto manje efikasni.

Česta pojava kod SOD mimetika jeste da pored superoksid dismutazne poseduju i katalaznu aktivnost, tj. da mogu da razgrađuju vodonik peroksid. Da bismo ovo proverili, kompleksi su inkubirani sa vodonik peroksidom čija je koncentracija merena posle pet minuta (slika 3). Kompleksi Ni(II) i Cu(II) nisu pokazali katalaznu aktivnost, dok je najveća aktivnost primećena kod kompleksa Mn(II). Katalazna aktivnost nađena kod kompleksa mangana može da objasni nešto niže vrednosti nađene pri određivanju SOD aktivnosti ovog kompleksa. Interesantno je da sam bacitracin ima izrazitu katalaznu aktivnost, što nije prijavljeno u ranijim radovima.

Tabela 2. Antibakterijsko dejstvo kompleksa i bacitracina izraženo preko prečnika zone inhibicije u antibiogram testu.

Kompleks	Prečnik zone inhibicije [mm]
bA	16.0±0.5
Ni(II)-bA	20.0±0.5
Fe(III)-bA	17.0±0.5
Cu(II)-bA	19.0±0.5
Mn(II)-bA	26.0±0.5

Prethodni radovi (Piacham *et al.* 2006.) pokazali su da metalokompleksi bacitracina takođe imaju antibakterijski efekat. Da bi ovo testirali za naše komplekse primenili smo antibiogram test na soju *Staphylococcus aureus*. Nakon inkubiranja bakterija sa različitim kompleksima i samim bacitracinom, uočeno je prisustvo zone inhibicije u svim slučajevima. Kompleksi Cu(II), Ni(II) i Mn(II) pokazali su značajno veće inhibiranje



rasta soja *S. Aureus* u odnosu na sam bacitracin (tabela 2. i slika 4). Fe(III) bacitracin nije dao statistički značajan porast inhibicije.

Zaključak

Dobijeni rezultati jasno ukazuju da za razliku od samog bacitracina kompleksi Cu(II), Fe(III), Ni(II) i Mn(II) sa bacitracinom pokazuju jasnu SOD aktivnost, što je potvrđeno modifikovnim NBT esejem kao i merenjem produkcije vodonik peroksida. Kompleksi Fe(III) i Mn(II) pokazuju takođe i katalaznu aktivnost, koju u velikoj meri pokazuje i sam bacitracin. Ovo je prvi put da je pokazana katalazna aktivnost bacitracina i priroda ovakvog delovanja ovog antibiotika ostaje da bude ispitana u daljim istraživanjima. Svi kompleksi su takođe pokazali i antibakterijsku aktivnost prema soju *Staphylococcus aureus*, od čega je kompleks sa manganom izrazito aktivan u poređenju sa samim antibiotikom. Ovi rezultati otvaraju vrata jednom novom pravcu ispitivanja metalnih kompleksa makrocikličnih antibiotika i njihove primene u suprimiranju oksidativnog stresa, ali i pojačavanju antibakterijskog dejstva.

Slika 4 (opposite page).

Antibiogram test rađen na soju *Staphylococcus aureus*.

- A) etanol;
- B) bacitracin;
- C) Ni(II) bacitracin;
- D) Fe(III) bacitracin;
- E) Cu(II) bacitracin;
- F) Mn(II) bacitracin

Figure 4 (opposite page).

Antibiotic susceptibility testing on a clinical strain of *Staphylococcus aureus*.

- A) ethanol;
- B) bacitracin;
- C) Ni(II)-bacitracin;
- D) Fe(III)-bacitracin;
- E) Cu(II)-bacitracin;
- F) Mn(II)-bacitracin

Literatura

- Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., Salvemini D. 2001. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews*, **53**: 135.
- Filipovic M., Stanic D., Raicevic S., Spasic M., Niketic V. 2007. Consequences of MnSOD interactions with NO: NO dismutation, peroxynitrite and H₂O₂ generation. *Free Rad. Res.*, **41**: 62.
- Gao-Feng L., Filipovic M., Heinemann F. W., Ivanovic-Burmazovic I. 2007. Seven-coordinate iron and manganese complexes with acyclic and rigid pentadentate chelates and their superoxide dismutase activity. *Inorg Chem.* In press
- Garbutt J. T., Morehouse A. L., Hanson A. M. 1961. Food additives, metal binding properties of bacitracin. *J. Agric. Food Chem.*, **9**: 285.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: University Press
- Liu Y., Peterson D., Kimura K., Schubert D. 1997. Mechanism of cellular tri-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (ntt reduction). *Journal of Neurochemistry*, **69**: 581
- Mandel R., Ryser H. J., Ghani F., Wu M., Peak D. 1993. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 4112.
- Ming L. J., Epperson J. D. 2002. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J. Inorg. Biochem.*, **91**: 46.
- Piacham T., Isarankura-Na-Ayudhya C., Nantasenamat C., Yainoy S., Ye L., Bulow L., Prachayacitticul V. 2006. Metalloantibiotic Mn(II)-baci-

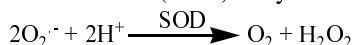
- tracin complex mimicking manganese superoxide dismutase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **341**: 925.
- Riley D. P. 1999. Functional mimics of superoxide dismutase enzymes as therapeutic agents. *Chem. Rev.*, **99**: 2573.
- Ryser H. J., Levy E. M., Mandel R., DiSciullo G. J. 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **10**: 4559.
- Salvemini D., Riley D. P., Cuzzocrea S. 2002. SOD mimetics are coming of age. *Nat. Rev. Drug Discover.*, **1**: 367.

Vladimir Prokopović

Antibacterial and Superoxide Dismutase Activity of Metallo-bacitracin Complexes

Superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) is the reactive radical anion formed following a one-electron reduction of dioxygen during numerous oxidation reactions under normal conditions in both living and nonliving systems. Because it is a very good reducing agent in the anionic form and a very good oxidant in the protonated form, superoxide is potentially dangerous for all cellular macromolecules and can generate other undesired reactive species. Its damaging effects lead to different pathophysiological conditions that cause aging, pain, inflammatory disorders, serious neurodegenerative diseases, and multiple types of cancer. Therefore, the concept of removing superoxide via rapid disproportionation, i. e. dismutation, has a protective beneficial outcome in a large number of diseases caused by the overproduction of superoxide radicals.

Natural superoxide dismutase (SOD) enzymes catalyze reactions:



This calls for new types of free-radical inhibiting enzyme mimetics to be used as pharmaceuticals. The stable low molecular weight metal complexes that can react with superoxide and efficiently replicate the activity of the native SOD enzyme have the potential to become a new generation of drugs for the treatment of diseases of various aetiologies.

Bacitracin is a metal-dependent dodecapeptide antibiotic produced by *Bacillus* species (e. g. *Bacillus licheniformis*). Bacitracin is effective against Gram-positive bacteria by inhibiting the synthetic pathway for cell wall formation. Bacitracin provides strong affinity to divalent metal ions such as Zn(II), Cu(II), Co(II), and Mn(II) in the formation of 1:1 complex.

The aim of this study was to examine SOD activity of bacitracin-based complexes and to see their antibacterial activity. Bacitracin based

complexes with metal ions: Mn(II), Fe(III), Cu(II) and Ni(II) were synthesized and their SOD activity confirmed by two essays. The nitroblue tetrazolium (NBT) essay is based on one-electron reduction of NBT by superoxide to blue product, formazan. The concentration of putative mimetic that produces a 50% of inhibition of formazan formation is called IC₅₀ and it is used to compare with other SOD mimics. All complexes showed SOD activity of which Fe(III) and Mn(II) had the highest activity. SOD activity was also confirmed measuring the product of superoxide dismutation, hydrogen peroxide.

It is well known that some metal complexes that possess SOD activity show catalyzing activity as well. This means that they are able to further dismutate hydrogen peroxide to water and oxygen. We tested this with bacitracin-based mimics and the Mn(II)bacitracin complex was the only one that showed pronounced catalyzing activity. This result showed that the manganese complex of bacitracin is the most prominent among other complexes in terms of defence against oxidative stress.

When the antibacterial activities of complexes were compared with bacitracin, some of them showed a much higher antibiotic activity than bacitracin itself. Again, the manganese complex was the most efficient in preventing growth of *Staphylococcus aureus*.

Taken together these results shed a new light on the development of novel SOD mimics for pharmaceutical use, underlying the multi-functionality of bacitracin based complexes which can be used as superoxide dismutases, catalases and antibiotics.

