

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Bojana M. Božić Cvijan

***In vitro* interakcije jona bakra sa
bilirubinom i β -laktamskim antibioticima**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Bojana M. Božić Cvijan

***In vitro* interactions of copper ions with
bilirubin and β -lactam antibiotics**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

PODACI O MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor

Prof. dr Milica Bajčetić, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu

Komentor

N. sav. dr Ivan Spasojević, Institut za multidisciplinarna istraživanja
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Zoran Todorović, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Ćirković, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
3. Doc. dr Dragana Protić, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
4. Doc. dr Janko Samardžić, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu
5. Prof. dr Edvard Petri, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Univerzitet u Novom Sadu

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru, profesorki dr Milici Bajčetić na ukazanom poverenju, na stručnoj i pre svega prijateljskoj pomoći u toku mog celokupnog dosadašnjeg rada.

Srdačno se zahvaljujem komentoru, naučnom savetniku dr Ivanu Spasojeviću, na aktivnom učešću, sugestijama i nesebičnoj podršci u svim fazama izrade ovog rada.

Zahvaljujem se članovima komisije na dragocenim savetima, podršci i strpljenju.

Veliku zahvalnost dugujem naučnom savetniku dr Jeleni Bogdanović Pristov, istraživačima saradnicima Jeleni Korać i Milošu Opačiću na svestranoj pomoći, odvojenom vremenu i beskrajnom strpljenju za brojna objašnjenja i uvođenje u svet hemije.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na bezrezervnoj ljubavi, podršci i veri u svaki moj izbor.

***In vitro* interakcije jona bakra sa bilirubinom i β -laktamskim antibioticima**

REZIME

Koncentracija jona bakra (Cu^{2+}), kao esencijalnog mikroelementa neophodnog u delovanju brojnih enzima ali i potencijalno toksičnog metala, u humanoj plazmi je striktno regulisana. Poremećaj u koncentraciji jona bakra je opisan kod brojnih bolesti poput neonatalne hiperbilirubinemije, infekcija, inflamatornih stanja, Vilsonove bolesti, dijabetesa, oboljenja jetre. Sa stanovišta patoloških stanja redoks potencijal jona bakra, mogućnost stupanja u koordinativne reakcije i formiranja kompleksa sa biomolekulima pa i lekovima može uticati na tok i efekte terapije. Do sada je opisano nekoliko mehanizama bakrom indukovanoг ćelijskog oštećenja poput učestvovanja u stvaranju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), redoks reakcija sa molekulima tiola i indirektni uticaj na stvaranje ROS i formiranje koordinacionih kompleksa.

U pogledu infekcija potencijalne interakcije između jona bakra i antibiotika mogu biti od velike važnosti. Praćenjem pomenutih interakcija ukazano je na postojanje takozvanih bakar-zavisnih antibiotika za čiju aktivnost je neophodno prisustvo jona bakra. Takođe studije izvedene u nefiziološkim uslovima su izučavale i mogućnost nastanka kompleksa ili koordinativnih reakcija između bakra i brojnih antibiotika poput fluorohinolona, aminoglikozida, pojedinih cefalosporina ali sa promenljivim rezultatima na antimikrobnu aktivnost. Usled nedostatka ispitivanja u fiziološkim uslovima sam mehanizam interakcija jona bakra i pojedinih antibiotika ostao je nedorečen. U slučajevima neonatalne žutice, koja se javlja usled povišenog broja eritrocita i nezrelosti jetre, ali i u slučajevima sepsa kroz oštećenje eritrocita, interakcije bilirubina (BR) i bakra mogu biti važne za objašnjenje toksičnih efekata nekonjugovanog (nevezanog za albumin) bilirubina, ali i za uspešnost antibiotske terapije. Dokazi iz nekoliko studija upućuju na značaj interakcija BR i bakra: neuralni defekti u slučajevima hiperbilirubinemije se najčešće javljaju na nivou bazalnih ganglija gde je i koncentracija bakra najviša; kod neonatusa sa hiperbilirubinemijom zabeleženi su povišeni nivoi jona bakra i malondialdehida, kao markera lipidne peroksidacije. U slučajevima

hiperbilirubinemije kada je koncentracija teških metala povišena, pozitivne efekte na ishod terapije je pokazala primena penicilamina, koji deluje kao helator bakra i smanjuje nivo slobodnih radikala.

Cilj ovog istraživanja je bio da se opiše mehanizam *in vitro* interakcija jona bakra sa BR i β -laktamskim antibioticima. Analize su urađene pomoću sledećih metoda: ultraljubičaste/vidljive spektroskopije, elektron paramagnetne rezonancije, ciklične i pulsne voltometrije, merenjem potrošnje kiseonika uz pomoć polarografije, merenjem minimalne inhibitorne koncentracije na odabranim bakterijskim sojevima i merenjem lipidne peroksidacije i hemolize.

Naše istraživanje je pokazalo da molekul BR redukuje Cu^{2+} do Cu^{1+} , u odnosu 1:1, te da BR i Cu^{2+} ne formiraju stabilni kompleks. Stvoreni Cu^{1+} podleže spontanoj oksidaciji u prisustvu kiseonika i ponovo se stvara Cu^{2+} uz istovremenu produkciju vodonik peroksida i hidroksilnog radikala preko redukcije molekuskog kiseonika do superoksida odnosno kroz Fentonovu reakciju. Upravo stvaranje pomenutih slobodnih radikala nastalih kao posledica reakcije BR i Cu^{2+} može biti odgovorno za toksične efekte u stanjima hiperbilirubinemije. U skladu sa ovim dobijenim rezultatom je i oštećenje eritrocitnih membrana prilikom istovremenog izlaganja BR i Cu^{2+} . Vezivanje Cu^{2+} za fosfate u rastvoru, fosfatne grupe na lipozomima ili helirajući agens penicilamin, dovodi do smanjenja štetnih efekata BR i Cu^{2+} . U pogledu analize interakcija sa β -laktamskim antibioticima, opaža se da penicilin G ne stupa u interakcije sa Cu^{2+} . Ampicilin, amoksicilin i cefaleksin i Cu^{2+} formiraju oktaedraelni kompleks sa tetragonalnom distorzijom sa Cu^{2+} . Rezultati našeg istraživanja upućuju na primarnu amino grupu na bočnom lancu kao mesto vezivanja bakra za ove antibiotike. Takođe tri pomenuta antibiotika dovode do porasta u koncentraciji rastvorljivog Cu^{2+} u fosfatnom puferu. Slične geometrije je i kompleks ceftazidima i Cu^{2+} , s tim što je formiranje ovog kompleksa praćeno stvaranjem organskog radikala. Ceftriakson- Cu^{2+} kompleks je bio drugačije geometrije. Cefaklor redukuje Cu^{2+} do Cu^{1+} koji potom reaguje sa kiseonikom i dovodi do stvaranja vodonik peroksida. Meropenem se razgradio u prisustvu Cu^{2+} . Svi ispitivani antibiotici koji stvaraju komplekse sa Cu^{2+} su u 1:1 stehiometrijskom odnosu. Analizom minimalne inhibitorne koncentracije na sojevima *E. coli* i *S. aureus* uočava se da prisustvo Cu^{2+} slabi antimikrobni potencijal ampicilina, amoksicilina, ceftriaksona i meropenema dok je delovanje cefaleksina i cefaklora blago pojačano u prisustvu Cu^{2+} .

U zaključku možemo istaći da *in vitro* opisani mehanizmi interakcija Cu^{2+} i BR, kao i Cu^{2+} i β -laktamskih antibiotika mogu biti od kliničkog značaja u stanjima koja karakterišu promene u koncentraciji Cu^{2+} . Sveukupni rezultati upućuju na potrebu nastavka ispitivanja, od *in vitro* ka *in vivo* studijama.

Ključne reči: jon bakra, bilirubin, beta-laktamski antibiotik, interakcije, penicilamin, kompleks

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Medicinska farmakologija

UDK broj:

***In vitro* interactions of copper ions with bilirubin and β -lactam antibiotics**

SUMMARY

The concentration of copper ions (Cu^{2+}) in human body plasma is tightly regulated since they are cofactors of numerous enzymes, but also highly toxic to the cell. Cu^{2+} disbalans can be seen in neonatal hyperbilirubinemia, infections, inflammatory diseases, Wilson's disease, diabetes mellitus, liver disorders. Coordination, redox interactions or formation of complexes between copper and biomolecules can affect therapy. So far, several mechanisms of copper induced cell damage had been proposed such as increased ROS production, redox reactions with thiols and indirect ROS creation, and formation of coordination complexes.

In case of infection, possible ineractions of Cu^{2+} and antibiotics could be of great importance. Detailed analysis of mentioned interactions showed existance of so-called copper-dependant antibiotics. These antibiotics are only active in presence of copper ions. Also, previous studies conducted in non-physiological conditions reported possible coordinative interactions or formation of complexes between Cu^{2+} and antibiotics such as fluoroquinolones, aminoglycosides, several cephalosporins but with inconsistent results regarding antimicrobial activity. Still, studies of interaction between copper ions and antibiotics under physiological conditions are lacking. This leads to poor understanding of mechanism and undetermined clinical impact of copper interactions with antibiotics in everyday use. In cases of neonatal jaundice which can occur due to higher number of erythrocytes, immaturity of liver or in case of erythrocytes damage in sepsis, interactions of Cu^{2+} with bilirubin (BR) may be an important part of toxicity caused by unconjugated BR (not bound to albumin). Also, these interactions may have impact on the effectiveness of antibiotic therapy. Results from several studies showed indirect evidence for this: neural injury in hyperbilirubinemia occurs primarily in basal ganglia, which showed higher copper content compared to other brain regions; neonates with hyperbilirubinemia showed increased plasma levels of copper and

malondialdehyde, marker of lipid peroxidation. Penicillamine, as copper-chelation agent which reduces ROS levels showed beneficial effects in neonatal hyperbilirubinemia.

The aim of this study was to investigate mechanism of *in vitro* interactions of copper and BR and β -lactam antibiotics. Set of experiments was conducted at physiological pH 7.4 using following methods: UV-VIS spectrophotometry, electron paramagnetic resonance, cyclic and differential pulse voltammetry, measuring concentration of oxygen using polarography, defining minimum inhibitory concentration on selected bacterial strains and measuring malondialdehyd and hemoglobin as markers of lipid peroxidation and hemolysis.

Our study showed that BR reduces Cu^{2+} to Cu^{1+} , in 1:1 stoichiometry, whereby BR and Cu^{2+} do not form stable complexes. Cu^{1+} undergoes spontaneous oxidation by O_2 which results with Cu^{2+} and with production of hydrogen peroxide and hydroxyl radical through reduction of molecular oxygen to superoxide via Fenton-like reaction. Copper and BR induced oxidative stress can be responsible for toxic effects observed in neonatal hyperbilirubinemia and for damaging effects on erythrocytes membranes. The binding of Cu^{2+} to phosphates in solution, liposomal phosphate groups, or to chelating drug penicillamine, impedes redox interactions with BR. Regarding copper interactions with β -lactam antibiotics, it is observed that penicillin G does not interact with Cu^{2+} . Ampicillin, amoxicillin and cephalexin formed stable complexes with Cu^{2+} with octahedral coordination environment and tetragonal distortion. Primary amine group on side-chain was marked as the site of coordinate bond formation. These three β -lactams increased the solubility of Cu^{2+} in the phosphate buffer. Ceftazidime and Cu^{2+} formed a complex with a similar geometry and gave rise to an organic radical. Ceftriaxon- Cu^{2+} exhibited different geometry. Cefaclor reduced Cu^{2+} to Cu^{1+} that further reacted with molecular oxygen to produce hydrogen peroxide. Meropenem underwent degradation in the presence of copper. All antibiotics that formed complex with Cu^{2+} showed 1:1 stoichiometry. The analysis of minimum inhibitory concentration against *E. coli* and *S. aureus* showed that the effects of ampicillin, amoxicillin, ceftriaxone and meropenem were significantly hindered in the presence of copper ions, while the effects of cephalexin and cefaclor were slightly increased.

In conclusion, we may emphasize that described mechanism of interactions of BR and β -lactam antibiotics with copper ions can be of great impact in conditions characterized with copper disbalans. The elucidated mechanisms warrant further research on this topic, from *in vitro* to *in vivo* studies.

Keywords: copper ion, bilirubin, β -lactam antibiotic, interactions, penicillamine, complex

Scientific field: Medicine

Major in: Medical Pharmacology

UDK:

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Uloga jona bakra u organizmu.....	1
1.1.1. Mehanizmi toksičnosti jona bakra.....	4
1.1.2. Uticaj jona bakra na pojavu bakterijske rezistencije.....	5
1.2. Interakcije jona bakra sa antibioticima.....	6
1.3. Beta-laktamski antibiotici.....	9
1.3.1. Interakcije jona bakra sa β -laktamskim antibioticima.....	11
1.3.2. Interakcije jona bakra sa penicilinima.....	12
1.3.3. Interakcije jona bakra sa cefalosporinima.....	13
1.4. Bilirubin.....	14
1.4.1. Efekti bilirubina.....	17
1.4.2. Efekti bilirubina u neonatalnoj hiperbilirubinemiji.....	18
1.5. Interakcije bilirubina i jona bakra.....	19
1.6. D-penicilamin.....	21
2. CILJEVI RADA.....	23
3. MATERIJAL I METODE.....	24
3.1. Supstance.....	23
3.2. Biohemijska procedura uzorkovanja krvi.....	25
3.2.1. Određivanje malondialdehida.....	25
3.2.2. Određivanje hemoglobina u serumu.....	26
3.3. Ultraljubičasta-vidljiva (UV-VIS) spektroskopija.....	26
3.4. Oksimetrija.....	28
3.5. Elektron paramagnetna rezonancija.....	29
3.6. Ciklična i diferencijalna pulsna voltometrija.....	33
3.7. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).....	35

3.8. Statistička obrada podataka.....	36
4. REZULTATI.....	37
4.1. Bilirubin i Cu^{2+}	37
4.1.1. UV-VIS spektroskopija.....	37
4.1.2. Ciklična i diferencijalna pulsna voltometrija.....	39
4.1.3. EPR analiza.....	42
4.1.4. Oksimetrija.....	43
4.1.5. Lipidna peroksidacija i hemoliza.....	45
4.2. B-laktamski antibiotici i Cu^{2+}	47
4.2.1. UV-VIS spektroskopija.....	47
4.2.2. Oksimetrija.....	49
4.2.3. EPR analiza.....	50
4.2.4. Ciklična voltometrija.....	52
4.2.5. MIK.....	54
5. DISKUSIJA.....	55
6. ZAKLJUČCI.....	65
7. LITERATURA.....	67

1. UVOD

1.1. Uloga jona bakra u organizmu

Bakar (Cu^{2+}) je prelazni, esencijalni mikro element, koji se u fiziološkim uslovima u serumu nalazi u dva oblika, Cu^{1+} i Cu^{2+} , gde je druga forma stabilna (Ince i sar., 2008; Iakovidis i sar., 2011). Bakar je redoks aktivni metal, koji lako donira i prima elektrone i učestvuje u formiranju koordinativnih veza (Božić i sar., 2018). Koncentracija jona bakra u telesnim tečnostima je striktno regulisana zbog učešća u radu brojnih enzima, ali i zbog mogućih patoloških stanja i toksičnih efekata koji mogu nastati prilikom promena u njegovoj koncentraciji (Gaetke i Chow., 2003). Ukupna koncentracija bakra u organizmu je od 80 do 150 mg, odnosno 1.6-2.4 mg/kg (Borow i Gabbay, 2005; Ince i sar., 2008). Tokom prenatalnog perioda joni bakra se nakupljaju u poslednjem trimestru i sve do kraja prvog meseca po rođenju njegova koncentracija je značajno manja nego kod odraslih (Viktorinova, 2017). Od kraja prvog meseca pa do perioda između druge do pete godine života, koncentracija jona bakra u plazmi dostiže svoj maksimum nakon čega kreće postepeno opadanje (Viktorinova, 2017). Koncentracija bakra u serumu zdravih, odraslih ljudi je procenjena na 1.08 mg/L (Kubala-Kukus i sar., 2014).

Prosečan unos jona bakra putem hrane je 2-4mg dnevno, a od ove količine 50-80% se resorbuje. Najveći stepen resorpcije se dešava na nivou duodenuma. Stepent resorpcije bakra zavisi od količine unetog bakra, njegove hemijske forme, pola (osobe ženskog pola imaju veći stepen resorpcije) i načina ishrane (prisustvo cinka u hrani dovodi do takmičenja sa jonima bakra za vezna mesta u metaloproteinima) (Ince i sar., 2008). Joni bakra prolaze membranu enterocita preko CTR1 transportera, a u daljem sekretornom putu su ključni ATP7A i ATP7B membranski proteini. ATP7A se nalazi u gotovo svim ekstrahepatičnim tkivima, a ATP7B se eksprimira najviše u jetri, a manje u mozgu, bubrezima, placenti i plućima (Telianidis i sar., 2013). Kod ljudi produkti ATP7A gena funkcionišu kao intracelularna pumpa za transport bakra u Goldžijev kompleks gde je neophodan za ugradnju u bakar-zavisne enzime (Lutsenko i sar., 2010).

ATP7B je neophodan za sekretorni put i ugradnju bakra u apoceruoplazmin i ekskreciju u žuč (Telianidis i sar., 2013). Približno 95% bakra prisutnog u plazmi se nalazi u okviru ceruloplazmina (Lowe i sar., 2017). Ceruloplazmin dovodi bakar do tkiva, a višak vraća u jetru odakle se izlučuju pomoću ATP7B enzima (Ince i sar., 2008; Iakovidis i sar., 2011; Lowe i sar., 2017). Hepatociti imaju ključnu ulogu u homeostazi jona bakra i u njima se skladišti 50% ukupne količine jona bakra u organizmu (Viktorinova, 2017).

Joni bakra učestvuju u delovanju preko 30 enzima (Grass, 2011). Cu^{2+} je neophodan za funkcionisanje metaloenzima poput amino oksidaze, askorbat oksidaze, ceruloplazmina, citohroma c oksidaze, superoksid dismutaze, dopamine-b-hidroksilaze, lizil oksidaze i tirozinaze (Gaetke i Chow, 2003). Imajući u vidu za koje enzime je neophodno učestvovanje jona bakra jasno je da je njegova adekvatna koncentracija neophodna za transfer elektrona tokom ćelijskog disanja, stvaranje energije, oksidaciju gvožđa, stvaranje pigmenta i vezivnog tkiva, biosintezu neurotransmitera i antioksidanta (Weinshilboum i Axelrod, 1971; Savini i sar., 1990; Smith-Mungo i Kagan, 1998; Schulpis i sar 2004; Valentine i sar., 2005; Akyilmaz i sar., 2012; Yoshikawa i sar 2012; Shepard i Dooley, 2015;).

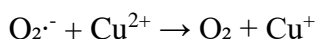
Do sada je deficijencija bakra povezana sa pojedinim patološkim stanjima poput Menkeovog sindroma, limfosarkoma, osteoporoze. Usled deficita jona bakra javlja se i deficit enzima za čije funkcionisanje je neophodan ovaj jon i posledično brojna patološka stanja. Deficit tirozinaze uzrokuje depigmentaciju (Solano, 2018); deficit dopamin β -hidroksilaze dovodi do aritmija, hiperlipidemija; deficit citohrom c oksidaze uzrokuje hipotoniju, ataksiju, apneju i psihomotornu deficijenciju, aritmije, hiperlipidemije (Li i sar., 2005; Ince i sar., 2008). Takođe, smanjenje u koncentraciji jona bakra je opisano i kod neutropenije, kao i poremećaja u sazrevanju i proliferaciji leukocita (Djoko i sar., 2015; Dalecki i sar., 2017;). Studije na životinjama su pokazale da je deficijencija jona bakra tokom trudnoće povezana sa intrauterinim zastojem u rastu, otežanim porođajem i kongenitalnim malformacijama (Wasowicz i sar., 1993). S druge strane i povišena koncentracija jona bakra je uključena u niz patoloških stanja kao što su neonatalna hiperbilirubinemija (žutica) kod pretermijskih i terminskih neonatusa, infekcije, inflamacija, Alzheimerova bolest, dijabetes, oboljenja jetre, Vilsonova bolest (Schulpis i sar., 2004; Ince i sar., 2008; Scheiber i sar., 2014; Lowe i sar., 2017).

Nakon što je prepoznata uloga jona bakra u urođenom imunskom odgovoru, interesovanje za ovaj jon je poraslo. Među brojnim ulogama jona bakra, opisana je i citotoksična uloga. Naime tokom 2000. godine u eksperimentima na izolovanim hepatocitima detaljno je objašnjena pojava citotoksičnosti indukovane jonima bakra. U okviru ove studije je pokazano da inkubacija hepatocita sa jonima bakra brzo povećava proizvodnju slobodnih radikala (Pourahmad i O'Brien, 2000). Studije na ćelijskim kulturama su pokazale da slobodni bakar na dozno zavisni način dovodi do citotoksičnosti i proizvodnje slobodnih radikala (Bopp i sar., 2008). Kao krajnji efekat oksidativnog stresa dolazi do oštećenja DNK, pa je bakru pored citotoksične pripisana i genotoksična aktivnost (Pra i sar., 2008). *In vitro* studija, korišćenjem ćelijskih kultura je pokazala da bakar dovodi do apoptoze pomoću kaspaza zavisnog i nezavisnog puta, kao i da je izazivanje apoptoze zavisno od koncentracije i vremena izloženosti jonima bakra (Santos i sar., 2016). Usled značaja koji ima disbalans jona bakra na nastanak brojnih oboljenja trenutno se sprovode brojna istraživanja u cilju objašnjenja mogućeg antimikrobnog, antivirusnog, antiinflamatornog i antitumorskog potencijala metalnih helatora jona bakra (Iakovidis i sar., 2011; Bonda i sar., 2012).

Uspešno delovanje bakra u prevenciji infekcija je poznato već hiljadama godina, od kada je bakar (II) sulfat korišćen u cilju prevencije infekcija rana (Borkow, 2014). U Persijskom carstvu posude od bakra su korišćene za dezinfekciju vode i čuvanje hrane (Lemire i sar., 2013). U vreme starih Grka i Rimljana, bakar i jedinjenja bakra su korišćena u lečenju infekcija uha, crevnih parazita i za održavanje higijene (Grass, 2011). Tokom vekova, uloga bakra je smatrana značajnom u slučajevima kolere, hroničnih upala, ekcema, impetiga, lupusa, sifilisa, anemije, facijalne neuralgije i brojnih infekcija sve do pojave antibiotika. Sa pojavom bakterijske rezistencije javilo se i interesovanje za drugačijim pristupom u antimikrobnoj terapiji pa i za ponovnom upotrebom Cu^{2+} (Grass, 2011). Sa druge strane, Cu^{2+} može kroz formiranje koordinativnih veza da utiče na efikasnost lekova.

1.1.1. Mehanizmi toksičnosti jona bakra

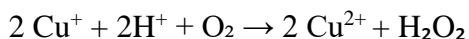
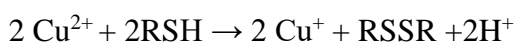
Do danas je predloženo nekoliko mogućih objašnjenja za bakrom indukovano ćelijsko oštećenje. Za sada najrasprostranjeniji je stav da je za delovanje jona bakra ključna njihova sposobnost da stupaju u reakcije oksidacije i redukcije i katalizuju stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (reactive oxygen species, ROS) (Angele-Martinez i sar., 2017). U prisustvu superoksida radikal anjona ($O_2^{\cdot-}$) ili drugih redukujućih agenasa, Cu^{2+} se redukuje do Cu^{1+} koji u reakciji sa vodonik peroksidom produkuje hidroksil radikala kroz Fentonovoj slične reakcije (Gaetke i sar., 2003; Angele-Martinez i sar., 2017):



Stvoreni hidroksil radikal je izuzetno reaktivan, sposoban da reaguje sa praktično svim biološkim molekulima, zbog čega mu je polu-život u živim sistemima procenjen na oko 1 ns. Hidroksil radikal pokreće ciklus oštećenja ćelijskih proteina, lipida, DNK i posledično, a može dovesti i do smrti ćelije ali i mikroorganizama (Buettner, 1993).

Citotoksično delovanje jona bakra se objašnjava i preko direktnih redoks reakcija sa molekulima tiola i preko indirektnog stvaranja ROS-a (Grass, i sar., 2011; Lemire i sar., 2013). HSAB teorija (hard-soft acid base; Pearsonova teorija) je koncept koji opisuje preferenciju metala ka formiranju koordinativnih veza sa određenim organskim ligandima. Na primer, meke kiseline poput Cu^{1+} i granično slabe kiseline poput Cu^{2+} imaju tendenciju da se vezuju sa sulfhidrilnim grupama (R-SH) proteina. Sama antibakterijska toksičnost metala je proporcionalna afinitetu prema sulfihrilnoj grupi (Lemire i sar., 2013). Po ovom objašnjenju joni bakra se kovalentno vezuju sa tioloima, dovode do stvaranja proteinskih disulfida i smanjenja antioksidanata, (naročito glutationa) (Lemire i sar., 2013). Od potencijalne važnosti za naše istraživanje su preferencije Cu^{2+} za vezivanje sa piridinom, a u slučaju Cu^{1+} za R_2S , C_6H_5 (Haas i Franz, 2009).

U slučaju sulfidrilnih grupa, Cu^{2+} može formirati kompleks ali i ući u redoks reakciju, što zavisi od karakteristika konkretne sulfhidrilne grupe, odnosno molekula koji nosi SH grupu i redukcionog potencijala te grupe. Standardni redukcionni potencijal za $\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^{1+}$ par na fiziološkoj pH je oko 150 mV. Kroz reakciju sa sulfhidrilnim grupama dolazi do redukcije Cu^{2+} do Cu^{1+} uz istovremenu oksidaciju tiola.



Stvoreni vodonik peroksid može dovesti do stvaranja hidroksil radikala i daljeg oštećenja ćelije. Mogući su i drugi mehanizmi citotoksičnosti jona bakra, koji pored redoks interakcija uključuju i formiranje koordinacionih kompleksa sa organskim i neorganskim ligandima.

1.1.2. Uticaj jona bakra na pojavu bakterijske rezistencije

Već dugo godina postoji pretpostavka o vezi između jona bakra i pojave bakterijske rezistencije (Poole, 2017). Kao i antibiotici, metali su izvori stresa za bakteriju. Na bakterijsku osetljivost na antibiotike veoma utiču adaptivni i protektivni odgovori na različite oblike stresa (Poole, 2017). U određenim slučajevima, metali remete bakterije na sličan način kao što to rade antibiotici, dovodeći do adaptacije na stres. Nova istraživanja pokazuju da prisustvo metala, među kojima i bakra utiče na genetske i fiziološke promene u bakterijskoj ćeliji dovodeći do rezistencije. Pokazana je veza između dugotrajnog izlaganja poljoprivrednog zemljišta povišenoj koncentraciji jona bakra sa povećanom ekspresijom antibiotskih gena rezistencije (antibiotic resistance genes, ARG) (Hu i sar., 2016). Čak i u relativno niskim koncentracijama, prisustvo Cu^{2+} u zemlji je u pozitivnoj korelaciji sa ARG (Poole, 2017). Pretpostavka je da kros-adaptacijom, izlaganjem i adaptacijom na jedan stress dolazi do bolje prilagođenosti na drugi tip stresa koji nastaje kasnije. Rezistentni sojevi salmonelle i enterokoka kod životinja su registrovani nakon davanja hrane koje je sadržala aditive sa jonima bakra (Poole, 2017). Zbog moguće transmisije rezistentnih bakterijskih sojeva sa

životinja na ljude ovakvi nalazi su od izuzetnog značaja. Pokazano je da joni bakra mogu delovati na promotorski gen koji je odgovoran za propustljivost ćelijske membrane gram negativnih bakterija (Yamamoto i sar., 2006), regulatorni gen koji je odgovoran za efluks lekova (Harrison i sar., 2009; Poole, 2017), ekspresiju represornog gena kod mikobakterija odgovornog za rezistenciju (Muding i sar., 2012) i posledično doprineti pojavi bakterijske rezistencije. Međutim, do smanjene efikasnosti antibiotika i pojave rezistencije u širem smislu može doći i kroz formiranje koordinativnih kompleksa i hemijske reakcije između bakra i antibiotika.

1.2. Interakcije jona bakra i antibiotika

Otkriće antibiotika predstavlja jednu od najznačajnijih prekretnica u medicini (Dalecki i sar., 2017). Nažalost, brzo po uvođenju antibiotika u kliničku praksu razvijena je i bakterijska rezistencija. Tokom “zlatnog doba”, 40tih i 60tih godina prošlog veka, otkriveni su gotovo svi antibiotici i njihovi derivati koji su do danas u svakodnevnoj kliničkoj upotrebi (Lewis, 2013). Unazad nekoliko decenija samo mali koraci su učinjeni u unapređenju antibiotske terapije pa se kao neizbežni zaključak nameće neophodnost drugačijeg pristupa u delovanju i otkrivanju antimikrobnih lekova (Lewis, 2015; Dalecki i sar., 2017).

Polovinom prošlog veka po prvi put su studije ukazale na promene u fizičko-hemijskim karakteristikama lekova, *in vitro* stabilnosti i *in vivo* promenama u distribuciji, transformaciji i eliminaciji lekova u prisustvu metala (Niebergall i sar., 1966). Već je poznato da je prilikom infektivnih bolesti promenjena koncentracija jona bakra, pa je moguće stvaranje kompleksa između jona bakra i antibiotika svakako od interesa (Dalecki i sar., 2017; Djoko i sar., 2018). Bakar može direktno uticati na aktivnost antibiotika stvarajući koordinativne veze i/ili stupajući u redoks interakcije (Božić i sar., 2018). Nekoliko značajnih interakcija jona bakra sa antibioticima koji se koriste u kliničkoj praksi je već opisano.

Tokom više godina praćenja interakcija između antibiotika i jona bakra došlo se do otkrića da postoje takozvani bakar-zavisni antibiotici, odnosno antibiotici koji

nemaju aktivnost u odsustvu jona bakra. Neki od primera su N₄-metil-tiosemikarbazon vs *MRSA*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*; disulfiram vs *Mycobacterium tuberculosis*; tiokarlid vs *MRSA* (Haeili i sar., 2014; Djoko i sar., 2015; Poole, 2017). Nekoliko hipoteza o delovanju bakrom zavisnih antibiotika je predloženo. U pogledu disulfirama i jona bakra jedna od mogućih pretpostavki je da pravljenjem kompleksa dolazi do stvaranja štita oko samog molekula jona bakra, čime se olakšava njegov ulazak u ćeliju i prevazilaženje bakterijskih mehanizama rezistencije (Dalecki i sar., 2015). Po ulasku u ćeliju joni bakra mogu ispoljiti svoje antibakterijsko dejstvo (Dalecki i sar., 2015).

Nastanak interakcija se opisuje i između jona bakra i tetraciklina (Dalecki i sar., 2017). Tetraciklini su često korišćena grupa antibiotika kako kod ljudi tako i kod životinja. Između 50% do 80% tetraciklina se izlučuju u nepromenjenom obliku, a s obzirom da se animalni otpad koristi kao izvor biljne hrane, akumulacija antibiotika u zemljištu izaziva veliku pažnju (Zhao i sar., 2013). Tetraciklini u svojoj hemijskoj strukturi sadrže više funkcionalnih grupa: pet hidroksilnih, dve karbonilne, i jednu amidnu (Zhao i sar., 2013). Molekuli tetraciklina prolaze membranu gram negativnih bakterija pozitivno naelektrisani, najverovatnije formirajući kompleks sa jonima magnezijuma (Chopra i Roberts, 2001; Dalecki i sar., 2017). U unutrašnjosti ćelije, tetraciklini deluju slobodno, vezujući se za ribosome. Zbog samog mehanizma delovanja, ne iznenađuje mogućnost interakcija sa jonima bakra. Do sada je *in vitro* model pokazao da tetraciklini vezuju jone bakra čime smanjuju njihovu povišenu koncentraciju na mestima infekcije (Dalecki i sar., 2017). Veruje se da će studije u narednom periodu objasniti da li na ovaj način nastale interakcije mogu umanjiti imuni odgovor i da li se antibakterijsko delovanje tetraciklina menja.

Fluorohinoloni takođe intereaguju sa jonima bakra. Jedan od najčešćih mehanizama rezistencije gram negativnih bakterija prema fluorohinolonima je smanjenje membranske propustljivosti koje nastaje zbog mutacija u ekspresiji pora. Iz tog razloga je pronalaženje novih načina prodiranja antibiotika u ćeliju od ključne važnosti u borbi protiv rezistencije (Sousa i sar., 2015). Jedan od mogućih načina je i građenje kompleksa sa dvovalentnim metalima. Naime, fluorohinoloni sadrže deprotonisanu karboksilnu grupu i karbonilnu grupu i lako stupaju u interakcije sa dvovalentnim katjonima poput Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ formirajući

komplekse u odnosu 1:1 ili 1:2 (Dalecki i sar., 2017). Do sada su se samo kompleksi sa Cu^{2+} pokazali stabilnim u fiziološkim uslovima (Sousa i sar., 2015). Antimikrobno delovanje kompleksa fluorohinolon- Cu^{2+} u odnosu na sam molekul fluorohinolona nije promenjeno na sojevima *Staphylococcus aureus*, ali je poboljšano na sojevima *Escherichia coli* (Sousa i sar., 2015; Dalecki i sar., 2017). Poboljšana difuzija formiranog hidrofobnog molekula u odnosu na samostalni antibiotik kroz ćelijsku membranu je verovatno objašnjenje poboljšanog antimikrobnog delovanja (Dalecki i sar., 2017).

Aminoglikozidi poput gentamicina, kanamicina i amikacina takođe stupaju u interakcije sa jonima bakra (Szczepanik i sar., 2004). Stvaranje ovih kompleksa u *in vitro* uslovima je praćeno oslobađanjem hidroksilnih radikala koji mogu oksidirati nukleinske baze i oštetiti nukleinske kiseline. Ranija istraživanja su toksične efekte aminoglikozida pripisala ovom sledu događaja (Szczepanik i sar., 2004). Tokom godina je pokazano da aminoglikozidi imaju manji afinitet ka vezivanju jona bakra u odnosu na helatore prisutne u humanoj plazmi čime se nametnuo zaključak da joni bakra imaju samo sporednu ulogu u ćelijskoj toksičnosti aminoglikozida (Lesniak i sar., 2003). Pri fiziološkim uslovima pH, baktericidno delovanje kanamicina A u kompleksu sa jonima bakra spram samog kanamicina A nije statistički značajno izmenjeno (Szczepanik i sar., 2003). Interakcije jona bakra pri fiziološkim pH uslovima su opisane i sa molekulima streptomocina i neomicina (Abu-el-wafa i sar., 1989; Jezowska-Bojczuk i sar., 2001). Koordinativnoj vezi streptomocina i bakra stvorenoj na nivou deprotonisanog kiseonika u alkoholnoj grupi je pripisana oksidativna aktivnost ovog kompleksa. Suprotno opisanoj situaciji interakcija aminoglikozida i jona bakra, Cu-linkomicin kompleks ne pokazuje uticaj na DNK, čime se pruža mogućnost i za primenu ovog kompleksa u kliničkoj praksi (Jezowska-Bojczuk i sar., 2001). Ispitivanjem kompleksa Cu^{2+} -neomicina uočeno je smanjenje biološke aktivnosti u poređenju na samo delovanje neomicina (Abu-el-wafa i sar., 1989).

Nedavno objavljeno istraživanje sprovedeno na sojevima *E. coli*, kod pacijenata sa urinarnom infekcijom, ukazuje da joni bakra indirektno pomažu delovanje karbapenema (Djoko i sar., 2018). Naime rezultati ukazuju da Cu^{2+} deluje na inaktivaciju metalo- β -laktamaza, najverovatnije ometajući vezivanje jona cinka koji je neophodan za delovanje ovog enzima. Kako je enzim metalo- β -laktamaza odgovoran za

hidrolizu karbapenema (Bush, 2013), njegova deaktivacija pomoću jona bakra posleđično sprečava pojavu bakterijske rezistencije. Takođe ukazano je i na mogućnost delovanja jona bakra kao faktora koji remeti sintezu, sazrevanje i stabilnost metalo- β -laktamaza (Djoko i sar., 2018).

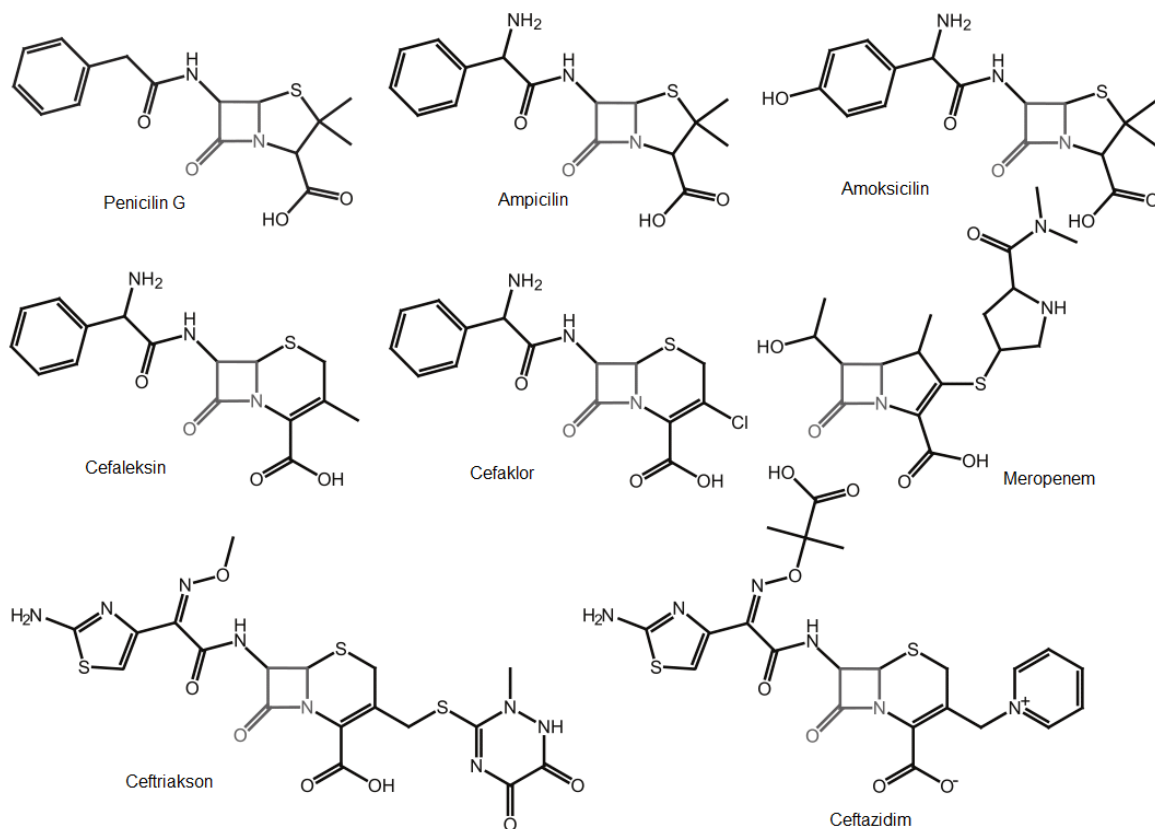
Važne interakcije su opisane i između Cu^{2+} i metronidazola (Joshua i sar., 2015). Na ovom primeru, interakcije se odvijaju preko atoma azota u imidazolskom prstenu (Galvan-Tejada i sar., 2002). Na ovaj način stvoreni kompleksi metronidazola i metalnih jona pokazuju veću stabilnost i zaštitu od moguće enzimske razgradnje (Galvan-Tejada i sar., 2002; Joshua i sar., 2015). Poboljšanje *in vitro* mikobaktericidne aktivnosti je opisano prilikom stvaranja kompleksa jona bakra sa izoniazidom (Hanson i sar., 1981). Ispitujući koordinativne veze između Cu^{2+} i tri atoma azota vankomicina, opisan je veliki afinitet vankomicina ka vezivanju jona bakra čime je postavljena pretpostavka da joni bakra mogu uticati na delovanje vankomicina, naročito prilikom primene antibiotika u višim dozama (Swiatek i sar., 2005). Veliko interesovanje za komplekse koje ovaj jon gradi sa antibioticima je uticalo da se tokom godina ispituju i njegovi kompleksi sa hloramfenikolom (Sakurai i sar., 1980) i novobiocinom (Jezowska-Bojczuk i sar., 2001). Studija koja je analizirala stvaranje kompleksa Cu^{2+} i makrolida je ukazala na pozitivnu korelaciju između konstanti formiranja metalnih kompleksa i veće antimikrobne aktivnosti (Hamdan, 2003).

1.3. β -laktamski antibiotici

Beta-laktamski antibiotici predstavljaju jedne od najčešće korišćenih antibiotika (Guo i sar., 2018). Penicilin je najstariji dostupni antibiotik i brzo po otkriću dobio je epitet "čudotvornog leka". Bez obzira na veliki uspeh u lečenju brojnih infekcija, njegovo delovanje nikada nije bilo usmereno ka svim bakterijama, a fenomen bakterijske rezistencije je samo pogoršao problem (Miller, 2002). Tokom godina sintetisani su novi penicilini u cilju proširenja antimikrobnog spektra i prevazilaženja bakterijske rezistencije (Tehrani i Martin, 2018).

Sami penicilini su prirodni ili sintetski antibakterijski agensi dobijeni od gljiva, molekularne formule $R-C_9H_{11}N_2O_4S$. Svi penicilini se sastoje od tri osnovne komponente: tiazolidinskog prstena, beta laktamskog prstena i bočnog lanca (Miller, 2002). Beta-laktamski prsten, 6-aminopeniciloinjska kiselina (6-APA) predstavlja ključ u sintezi i modifikaciji penicilina (Kong i sar., 2010). Kako je acilacijom 6-APA nastao penicilin V, otkriveno je da modulacijom bočnog lanca β -laktamskog prstena mogu nastati novi oblici leka. Dodavanjem amino grupe na penicilinsku strukturu nastali su aminopenicilini, ampicilin i amoksisilin (Kong i sar., 2010).

Paralelno sa razvojem polusintetskih jedinjenja, izolovan je i cefalosporin C iz soja *Cephalosporium acremonium* (Abraham i Newton, 1961). Po hemijskoj strukturi ova podgrupa se razlikuje u odnosu na peniciline u prisustvu 7-aminocefalosporinske kiseline (7-ACA) umesto 6-APA. Prsten karbapenema se razlikuje i od 7-ACA i od 6-APA (Kong i sar., 2010). Na Slici 1 je prikazana hemijska struktura β -laktamskih antibiotika koji su uključeni u naše istraživanje. Pored određenih sličnosti u hemijskog građi, β -laktamski antibiotici dele mehanizme dejstva i mehanizme nastanka rezistencije (Bycroft i Shute, 1985; Tipper, 1985; Auda i sar., 2008).



Slika 1. Strukturne formule β -laktamskih antibiotika (penicilin G, ampicilin, amokscilin, cefaleksin, cefaklor, ceftriakson, ceftazidim, meropenem)

1.3.1. Interakcije jona bakra sa β -laktamskim antibioticima

Sam β -laktamski prsten se dugo ispituje kao mesto na kome dolazi do razgradnje molekula pod dejstvom različitih agenasa poput enzima i metalnih jona (Guo i sar., 2018). Istraživanja su pokazala da su interakcije metalnih jona poput Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} sa beta-laktamskim antibioticima vrlo kompleksne prirode (Guo i sar., 2018). Nekoliko studija je do sada ukazalo na stvaranje kompleksa između molekula penicilina i cefalosporina sa jedne strane i jona bakra sa druge. Ipak, klinički značaj ovih interakcija se i danas ne može precizno opisati (Božić i sar., 2018). Takođe pojedine studije koje su do sada opisivale delovanje jona bakra na β -laktamske antibiotike sprovedene su pri nižim vrednostima pH tako da se rezultati mogu razlikovati u odnosu na očekivane pri fiziološkom pH (Cressman i sar., 1966; Niebergall i sar., 1966).

1.3.2. Interakcije jona bakra sa penicilinima

Studija iz 1968. godine je pokušala da objasni uticaj kompleksa metala i antibiotika, među kojima jone bakra i penicilina V i penicilina G (Niebergall i sar., 1966). Rezultati su upućivali na degradaciju penicilina i da se pod dejstvom razaranja β -laktamskog prstena oslobađa peniciloinska kiselina (Niebergall i sar., 1966). Studija iz 2010. godina je pružila dublji uvid o kompleksima jona bakra sa jedne strane i ampicilina i amoksicilina sa druge strane (El-Gamel, 2010). Disk difuzionom metodom na hranljivoj podlozi, rezultati pomenute studije su ukazali na poboljšanje u antimikrobnom delovanju ampicilina i amoksicilina u kompleksu sa jonima bakra na sojevima *Bacillus subtilis* i *E. coli*. Potentnije delovanje kompleksa je objašnjeno promenom u samoj veličini molekula nakon stvaranja veza sa jonima bakra. Spektroskopskim i fizičko-hemijskim metodama je predloženo da su stvoreni kompleksi skverne geometrije (El-Gamel, 2010).

S obzirom da se određeni procenat penicilina izlučuje u nepromenjenom obliku, njihovo prisustvo u zemljištu i vodi doprinosi pojavi bakterijske rezistencije (Guo i sar., 2018). Zbog prisustva jona metala u zemljištu, interakcije jona bakra i penicilina i na ovom nivou imaju značaja. U poređenju sa jonima žive, cinka i kobalta, joni bakra su se pokazali kao najpotentniji katalizatori hidrolize penicilina (Lapshin i Alekseev, 2009). Korak koji prethodi razgradnji je stvaranje kompleksa između bakra i penicilina (Guo i sar., 2018). Predloženo je nekoliko veznih mesta za pravljenje kompleksa poput atoma azota, karbonilne grupe, karboksilne grupe i primarne amino grupe (Guo i sar., 2018). Nedavno objavljeno istraživanje je pokazalo da joni bakra igraju dvojaku ulogu u razgradnji penicilina G, pored hidrolize imaju i ulogu oksidanta (Chen i sar., 2015). Takođe, u ovom procesu veliku ulogu ima i pH rastvora, pa je tako opisano da je proces oksidacije penicilina G najbrži u uslovima pH 7.0 (Chen i sar., 2015; Guo i sar., 2018). Sama promena pH utiče na protonaciju i deprotonaciju funkcionalnih grupa kao i na redoks ciklus jona bakra (Guo i sar., 2018). Skoro objavljena studija je pokazala da je Cu^{2+} posredovana razgradnja ampicilina pH i kiseonikom zavisna reakcija, a β -laktamski prsten je označen kao mesto oksidacije i hidrolize (Guo i sar., 2018).

1.3.3. Interakcije jona bakra sa cefalosporinima

Cefalosporini u prisustvu Cu^{2+} takođe mogu imati izmenjeni farmakološki profil. Studija iz 2008. godine je pokazala da joni bakra grade komplekse sa cefaleksinom, cefapirinom, cefamandolom, cefuroksimom, cefotaksimom i ceftazidimom (Auda i sar., 2008). Jedan od rezultata je i efikasnija antimikrobna aktivnost kompleksa. Disk difuzionom metodom je pokazano da je kompleks Cu^{2+} -cefaleksin efikasniji protiv sojeva *Staphylococcus aureus*, *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* (Auda i sar., 2008). U pogledu samog veznog mesta između cefaleksina i Cu^{2+} prema studiji iz 2004. godine koordinativne veze se stvaraju preko karboksilne, amidne karbonilne i amino grupe (Anacona i Rodriguez, 2004). Interesantni podaci su dobijeni u okviru ove studije i u pogledu antimikrobne aktivnosti. Naime, pokazana je poboljšana baktericidna aktivnost Cu^{2+} -cefaleksina kompleksa protiv *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella enteritidis*, ali bez delovanja na soj *K. pneumoniae* (Anacona i Rodriguez, 2004).

Tokom narednih godina nastavljeno je ispitivanje kompleksa između jona bakra i cefalosporina prve generacije. Zahid i saradnici su 2004. godine predložili da se vezivanje jona bakra sa cefazolinom ne dešava u okviru β -laktamskog prstena, već preko karboksilne grupe (Chohan i sar., 2004). Što se same antimikrobne aktivnosti tiče, ova studija je predstavila poboljšanje aktivnosti ovako stvorenih kompleksa na ispitivanim sojevima *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* (Chohan i sar., 2004). Na primeru Cu^{2+} -cefradin antibakterijsko delovanje je poboljšano jedino protiv sojeva *E. coli*, dok je delovanje na sojeve *S. aureus*, *Shigella sonnei*, *P. mirabilis* i *S. enteritidis* značajno slabije u odnosu na sam molekul cefadrina (Anacona i Acosta, 2005). Nasuprot studijama o antimikrobnom delovanju kompleksa Cu^{2+} -cefaleksina i Cu^{2+} -cefradina, su rezultati o nepromenjenom antibakterijskom potencijalu kompleksa jona bakra sa cefadroksilom, još jednim cefalosporinom prve generacije (Sayed i sar., 2009). Iako su literaturni podaci o uticaju jona bakra na cefalosporine novijih generacija oskudniji, studija iz 2011. godine je pokazala nepromenjenu antimikrobnu aktivnost Cu^{2+} -ceftriaksona u odnosu na sam ceftriakson na ispitivanim sojevima *E. coli*, *S. aureus* i *S. pneumoniae* (Ali, 2011).

Do sada je predloženo nekoliko mehanizama koji mogu dovesti do poboljšanog antimikrobnog efekta metalnih kompleksa i cefalosporina. Neka od njih su da proces helacije smanjuje polarnost i dovodi do povećanja liposolubilnosti centralnog metalnog jona čime se olakšava prolazak kroz lipidne membrane; ligandi koji sadže azot i kiseonik kao donorske grupe mogu inhibirati enzime za čiju aktivaciju su neophodne pomenute grupe (Chohan i sar., 2004; Chohan, Pervez i sar., 2004). Kao krajnji efekat svih predloženih mehanizama je veća bioraspoloživost antibiotika na mestu infekcije (Chohan, Pervez i sar., 2004). Nasuprot tome je objašnjenje da joni bakra mogu uticati na intestinalni transport pojedinih cefalosporina čime smanjuju njihovu koncentraciju na mestu delovanja i posledično slabe antimikrobno delovanje (Auda i sar., 2009).

Uvidom u do sada objavljene studije o uticaju jona bakra na antibiotike, može se uočiti da interakcije na nivou metala i antibiotika svakako postoje. Ipak dosadašnja ispitivanja i dalje ostavljaju nerazjašnjenim brojna pitanja o samom mehanizmu ovih interakcija. Takođe uočljiv je i nedostatak podataka o pomenutim interakcijama i antimikrobnom delovanju kompleksa pri fiziološkim uslovima.

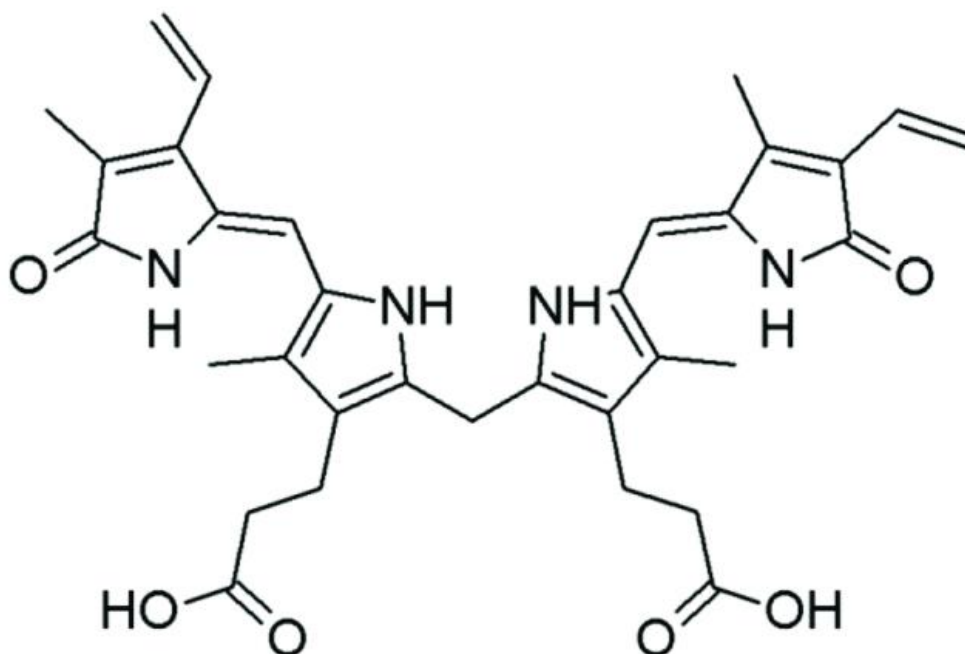
1.4. Bilirubin

Bilirubin (BR) je endogeni molekul koji u povišenoj koncentraciji može biti toksičan, naročito kod neonatusa, i može se koristiti kao marker brojnih oboljenja jetre i krvi (Fevery, 2008). BR se sastoji od tetrapiroloskog prstena i nastaje razgradnjom hema, primarno na nivou ćelija retikuloendotelnog sistema. Na Slici 2 je prikazana hemijska struktura molekula BR. Raspadom eritrocita dolazi do oslobađanja hemoglobina koji se sastoji od hema, gvožđa i globina (Fevery, 2008; Sticova i Jirsa, 2013). Na hem deluje hem oksigenaza pomoću koje se dešava oksidacija i otpuštanje atoma gvožđa i nastanak zelenog pigmenta biliverdina. U daljem sledu reakcija, pomoću NADPH zavisnog enzima, biliverdin reduktaze, nastaje narandžasto-žuti molekul – BR (Fevery, 2008; Maghzal i sar., 2009).

Nekonjugovani BR, formiran katabolizmom hema je zbog niske rastvorljivosti u vodi, preko 99.9% vezan za albumine (Ostrow i sar., 2004). Pojavu BR izazvane

neurotoksičnosti primarno određuje slobodni (nevezani) nekonjugovani BR u plazmi. Uzroci nekonjugovane hiperbilirubinemije su brojni poput povećane razgradnje eritrocita, nezrelosti jetre i infekcija. U zavisnosti od pH sredine nekonjugovani BR se može naći u obliku dikiseline, monoaniona ili dianjona (Wennberg, 1988; Fevery, 2008). Najveći procenat nevezanog nekonjugovanog BR se pri fiziološkim vrednostima pH nalazi u obliku neutralne dikiseline i ugrađuje se u ćelijsku membranu (Ostrow i sar., 2004).

Da bi sekrecija bilirubina preko žuči bila moguća neophodno je da dođe do konjugacije. Konjugacija se dešava u hepatocitima i posredovana je glukuronskom kiselinom (Sticova i Jirsa, 2013). Molekul bilirubina je osetljiv na svetlost i podložan je oksidaciji (Fevery i sar., 2008). U fiziološkim uslovima nivo bilirubina u krvi je 0.1-1.2 mg/dL, a nekonjugovanog 0.1-1.0 mg/dL. Umerena hiperbilirubinemija, do 2mg/dL obično nije praćena žuticom (Arora i sar., 2009).



Slika 2. Hemijska struktura bilirubina

Hiperbilirubinemija predstavlja nakupljanje bilirubina u plazmi i tkivima i često se viđa kod novorođenčadi (Božić i sar., 2017). Neonatalna žutica, takozvana fiziološka žutica, nastaje zbog više mogućih faktora: povišenog nivoa hemoglobina kod neonatusa u poređenju sa odraslima i posledično veće produkcije BR, smanjene koncentracije

albumina, nezrelosti sistema za konjugaciju, nezrelosti žučnih puteva, odsustva bakterijske flore i smanjene razgradnje BR (Fevery i sar., 2008). Uprkos pomenutim faktorima koji su odgovorni za nastanak neonatalne žutice, opažene su razlike u frekvenciji i težini BR encefalopatije verovatno se mogu objasniti različitom ekspresijom i funkcijom transportera koji odgovorni za transport nekonjugovani BR iz centralnog nervnog sistema (Ostrow i sar., 2004; Fevery i sar., 2008). U slučajevima neonatalne žutice, uloga nekonjugovanog BR je od posebnog značaja. Tkivo mozga je posebno osetljivo na toksične efekte nekonjugovanog BR. U slučajevima kad je koncentracija BR povišena iznad 25 mg/dL, može nastati kernikterus praćen značajnim oštećenjem slušne, mentalne i motorne funkcije (Wennberg i sar., 2006; Fevery i sar., 2008; Božić i sar., 2017) koji će biti detaljnije opisan u poglavlju o neurotoksičnim efektima BR. U kliničkoj praksi je potrebno obratiti posebnu pažnju na prevremeno rođenu decu, na stanja poput infekcija i seapse, jer utiču na selektivnost krvno-moždane barijere i doprinose lakšem prolasku BR do mozga (Dennery i sar., 2001). U zavisnosti od stepena hiperbilirubinemije razlikuju se i terapijski pristupi. Fototerapija najčešće brzo snižava koncentraciju BR i smanjuje potrebe za agresivnijim terapijskim pristupom (Dennery i sar., 2001). Delovanje se zasniva na ekscitaciji plavom svetlošću pošto je BR žuti pigment (talasna dužina oko 450nm), što dovodi do razgradnje BR. Prema preporukama Američke Akademije za Pedijatriju, u slučajevima neuspeha fototerapije može se pristupiti transfuziji (American Academy of Pediatrics, 2004). Danas je potreba za transfuzijom zbog hiperbilirubinemije značajno smanjena. Sama transfuzija sa sobom nosi i određen rizik za nastanak morbiditeta poput bradikardije, cijanoze, vazospazma, tromboze, nekrotizirajućeg enterokolitisa, ali i mortaliteta (American Academy of Pediatrics, 2004).

Pored neonatalne žutice, BR može biti povišen i kod drugih patoloških stanja, a najčešća podela žutice je na hepatičnu, prehepatičnu i posthepatičnu u zavisnosti od mesta gde dolazi do poremećaja u sintezi ili eliminaciji BR (Mancuso, 2017).

1.4.1. Efekti bilirubina

Kao što je pomenuto molekul BR nastaje od biliverdina dejstvom biliverdin reduktaze uz utrošak energije, a pre sekrecije u žučne puteve se konjuguje, opet uz utrošak energije. S obzirom da bi biliverdin mogao biti sasvim adekvatan produkt razgradnje hema (a takva situacija je kod ptica, vodozemaca i gmizavaca), postavilo se pitanje zašto uopšte nastaje potencijalno toksični molekul BR ukoliko ne poseduje fiziološku funkciju (Stocker i sar., 1987; Hansen i sar., 2018). Sama uloga BR se dugo izučava. Jedno od prvih objašnjenja zašto nastaje BR i koja je njegova svrha u organizmu je bila teorija po kojoj molekul bilirubina može proći kroz placentu lakše nego biliverdin. Ova teorija je odbačena jer se danas zna da se izomeri biliverdin reduktaze razlikuju kod fetusa i majke (Thomas i sar., 2004). Polovinom prošlog veka po prvi put je predstavljena uloga BR kao zaštitnog agensa pri oksidaciji lipida u fiziološkim uslovima (Thomas i sar., 2004). Pre skoro 40 godina po prvi put je predstavljen BR kao molekul koji ima snažnu antioksidativnu sposobnost (Stocker i sar., 1987). Nakon toga, nastavila su se istraživanja na ovom polju. Predložena antioksidativna sposobnost BR se ogledala u uklanjanju slobodnih radikala kao što su superoksid anjon i peroksidni radikal (Asad i sar., 2001). Studija objavljena 2003. godine je istakla ulogu BR u uklanjanju azotnog oksida (Mancuso, 2017). Nekoliko studija je povezalo umereno povećanje nivoa BR sa boljim ishodom kod pojedinih oboljenja povezanih sa oksidativnim stresom. Među njima su i studije koje su prikazale protektivno delovanje BR kod koronarne bolesti (Kang i sar., 2014), ishemijske srčane bolesti (Thomas i sar., 2004; Kang i sar., 2014), karcinoma (Gazzin i sar., 2016), Kronove bolesti (Lenicek i sar., 2014; Gazzin i sar., 2016), amiotrofične lateralne skleroze (Thomas i sar., 2004). Jedan od predloga je bio i da hiperbilirubinemija ima značajnu zaštitnu ulogu kod neonatusa s obzirom da u tom uzrastu antioksidativni sistemi zaštite nisu još razvijeni (Yigit i sar., 1999). Postoje i druga objašnjenja za ulaganje energije u konverziju biliverdina u BR. Na primer, ustanovljeno je da za razliku od biliverdina, BR aktivira antioksidativnu ćelijsku zaštitu kroz KEAP1-Nrf2 put (Nam i sar., 2018). S druge strane, Dimitrijević i saradnici su utvrdili da biliverdin formira specifičan kompleks sa bakrom, koji sadrži delokalizovan elektron (verovatna

struktura je biliverdin radikal katjon i Cu^{1+}), a čija (pato)fiziološka funkcija tek treba da bude ispitana (Dimitrijević i sar., 2019).

1.4.2. Efekti bilirubina u neonatalnoj hiperbilirubinemiji

Paralelno sa studijama o antioksidativnoj ulozi BR, javila su se i istraživanja o prooksidativnom delovanju BR kao i o njegovom toksičnom delovanju u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Mancuso, 2017). Jedna od zanimljivih studija je ispitivala i uticaj hiperbilirubinemije na preživljavanje kod neonatusa sa gram negativnom sepsom i dovela do zaključaka da BR ne poboljšava stopu preživljavanja kod neonatusa sa sepsom što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim na životinjama (Broek i sar., 2011). Studija koja je pratila oksidativni stres kod prevremeno rođenih beba je pokazala da je smanjenje koncentracije BR praćeno sa povećanjem antioksidativne sposobnosti kao i sa smanjenjem oksidativnog stresa (Dani i sar., 2003). Takođe i *in vitro* studija je ukazala da BR u koncentraciji višoj od 30mg/dL utiče na povišenu oksidaciju proteina, smanjenje adenozin trifosfatne aktivnosti i dovodi do promena na ćelijskoj membrani (Mireles i sar., 1999).

Neonatusi su dugo bili u centru ispitivanja delovanja BR (Thomas i sar., 2004). Kao što je pomenuto, u uslovima kada je koncentracija ukupnog BR povišena, a posledično i nekonjugovanog BR, može doći do neuroloških ispada kao što su ekstrapiramidalne abnormalnosti i gubitak sluha (Mancuso, 2017). Pokazano je da se BR nakuplja i u korteksu, hipokampusu, striatumu, srednjem mozgu, hipotalamusu, cerebelumu i meduli (Mancuso, 2017; Rennie i sar., 2018). Nekoliko faktora rizika doprinosi nastanku kernikterusa: Rh ili ABO inkompatibilnost, gestacijski dijabetes, traume pri rođenju, infekcije, policitemija, sepsa itd (Wennberg i sar., 2006; Mancuso, 2017; Viktorinova, 2017). Sa farmakološke strane, pojedini lekovi mogu uticati na oslobađanje BR sa albumina i time povećati rizik sa nastanak kernikterusa (Mancuso, 2017). Takođe lekovi mogu delovati inhibicijom P-glikoproteina, koji je odgovoran za influks različitih lipofilnih produkata, i na taj način doprineti riziku nastanka bilirubinske encefalopatije (Hanko i sar., 2003).

1.5. Interakcije bilirubina i jona bakra

Neurotoksični efekti BR se ispoljavaju putem oštećenja krvno-moždane barijere, oštećenja mitohondrija i/ili endoplazmatskog retikuluma. Predloženim mehanizmima dolazi do promena u koncentraciji jona, oksidativnog stresa i na kraju aktivacije apoptoze i nekroze (Mancuso, 2017; Viktorinova, 2017). Danas se pretpostavlja da je BR izazvana neurotoksičnost kompleksni proces koji se sastoji od međusobno isprepletenih metaboličkih puteva BR i jona metala. Sam stepen oksidativnog stresa može reflektovati nagomilavanje BR i redoks aktivnih metala u određenim delovima mozga (Buonocore, 2001). Iako se potencijalna uloga redoks aktivnih metala, među kojima i jona bakra, u bilirubinom izazvanoj neurotoksičnosti dugo ispituje, sam mehanizam ove interakcije i dalje nije do kraja objašnjen. U prisustvu jona bakra i jona gvožđa nekonjugovani BR ispoljava prooksidativne i citotoksične osobine. Zna se da je mozak neonatusa izuzetno osetljiv na povećanu produkciju ROS-a zbog sniženog nivoa antioksidativne zaštite (poput glutationa i ceruloplazmina), izmenjene aktivnosti superoksid dismutaze i poremećaja u homeostazi jona bakra i gvožđa (Viktorinova, 2017). Zato su istraživanja koja idu u pravcu ispitivanja metalom indukovanoj oksidativnog stresa bila i logičan sled ispitivanja neurotoksičnosti izazvane bilirubinom (Asad i sar., 2002; Viktorinova, 2017).

Zbog osobine da stupaju u redoks interakcije veruje se da joni gvožđa i joni bakra igraju ključnu ulogu u metalom indukovanom oksidativnom stresu (Fenton-slična reakcija) (Rouault i Cooperman, 2006; Scheiber i sar., 2014). Kao što je u poglavlju o ulogama jona bakra pomenuto, preko Fentonove reakcije dolazi do stvaranja vodonik peroksida i hidroksilnog radikala koji potom oštećuju biomolekule (Viktorinova, 2017). Veruje se da je bitan korak u nastanku bilirubinom indukovane neurotoksičnosti reakcija slobodnih radikala sa višestruko nezasićenim masnim kiselinama (Buonocore, 2001). Za normalno funkcionisanje, centralni nervni sistem troši 20% ukupne količine kiseonika. Prooksidativni uslovi u mozgu i visok nivo polinezasićenih masnih kiselina mogu uticati na oslobađanje metala sa različitih metaloproteina i doprineti nastanku ROS-a (Wasowicz, 1993; Viktorinova, 2017). Ipak zbog niske koncentracije jona bakra intracelularno veruje se da je njegovo delovanje u Fentonovoj reakciji u *in vivo*

uslovima ograničeno koncentracijom jona gvožđa i drugih redoks aktivnih metala (Rae i sar., 1999).

Joni bakra poseduju afinitet za vezivanje sa nekonjugovanim BR (Viktorinova, 2017). S obzirom da je veza između jona bakra i albumina slabija nego veza bakra i BR, lako može doći do stvaranja kompleksa nekonjugovani BR-bakar. Kako što je već objašnjeno, BR u svojoj strukturi sadrži pirolske komponente, međusobno povezane preko $-CH_2$ grupe (Boiadjev i sar., 1992). S obzirom da je BR elektronima bogat molekul lako stupa u koordinativne veze sa brojnim molekulima, među kojima su i metali (Božić i sar., 2017). Ovako stvoreni kompleks ima prooksidativnu ulogu u određenim regijama centralnog nervnog sistema, naročito na nivou bazalnih ganglija, hipokampusu i subtalamičnih jedara (Asad i sar., 2002; Viktorinova, 2017;). Interakcijom molekula BR i jona bakra dolazi do redukcije jona bakra od Cu^{2+} do Cu^{1+} i produkcije ROS-a, naročito hidroksilnih radikala i posledično dovodi do oštećenja ćelija (Fevery, 2008; Viktorinova, 2017). Smatra se da pomenuta interakcija između BR i Cu^{2+} može biti važan korak u patogenezi bilirubinske encefalopatije.

Literaturnim pregledom, uočavamo da je studija iz 1998. godine jedna od prvih koja je analizirala interakcije BR i jona bakra (Adhikari i sar., 1998). Zaključak studije je bio da Cu^{2+} i BR formiraju zelenkasti kompleks u odnosu 1:1, da BR može da veže jone bakra i kada su u kompleksu sa proteinima i na ovaj način može štiti sisare od trovanja bakrom (Adhikari i sar., 1998). Već sledeće godine objavljenja je studija koja je ukazala na redoks prirodu interakcija između molekula BR i bakra ukazavši na nastanak Cu^{1+} i ROS-a (Asad i sar., 1999). Isti tim saradnika je u svom daljem radu nastavio da ukazuje na uticaj stvorenih ROS-a na oksidativno oštećenje DNK-a (Asad i sar., 2002). Studija skorijeg datuma je taloženje kompleksa nekonjugovanog BR i bakra na nivou bazalnih ganglija označila kao ključan korak u nastanku bilirubinske encefalopatije. Hemolizom neonatalnih krvnih ćelija dolazi do oslobađanja velike količine teških metala, pa i bakra i posledično produkcije ROS-a. Usled nezrelosti krvno-moždane barijere i zbog njenog oštećenja usled delovanja slobodnih radikala joni bakra lakše prolaze do mozga i naročito do bazalnih ganglija (Lakatos i sar., 2016). Iz izloženog se vidi da interakcije BR i bakra nisu dovoljno objašnjene, i da postoji dilema

o stabilnosti kompleksa, odnosno o tome da li BR i bakar formiraju stabilan kompleks, ili dolazi do raspada kroz redoks reakcije.

1.6. D-penicilamin

Zbog svih pobrojanih razloga, tokom 70tih godina prošlog veka pojavilo se i razmišljanje o upotrebi D-penicilamina (D-PA) u terapiji neonatalne hiperbilirubinemije (Lakatos i sar., 2015). D-PA je D izomer dimetilcisteina i za sada je njegova upotreba odobrena u lečenju Wilsonove bolesti, cistinurije, u slučaju trovanja teškim metalima i kod pacijenata sa aktivnim reumatoidnim artritisom bez odgovora na konvencionalnu terapiju (Ishak i Abbas, 2013). Tokom procesa heliranja bakra D-PA redukuje Cu^{2+} u Cu^{1+} a sam se oksiduje u D-penicilamin disulfid (Birker i Freeman, 1977), ili povlači elektron iz dostupnih biomolekula. Ovakav tip helatora se naziva *non-innocent* (ne-nevini) helatri. Vezivanjem bakra za tiolnu grupu gradi se solubilni kompleks koji se izlučuje putem urina (Walshe, 1956). Delujući kao helator prooksidativnih teških metala D-PA ima potencijal da smanji nivo slobodnih radikala (Qureshi i Kumar, 2013). Kako je kod neonatusa povišena koncentracija jona bakra, a smanjena koncentracije proteina koji ga vezuju, predloženo je moguće protektivno delovanje D-PA u terapiji neonatalne hiperbilirubinemije (Qureshi i Kumar, 2013). Grupa mađarskih naučnika koja je predložila upotrebu D-PA na neonatološkim odeljenjima nije zabeležila pojavu akutnih niti odloženih neželjenih efekata ovog leka tokom više od 40 godina. D-PA je označen kao lek koji je efikasan, jeftin i bezbedan za primenu tokom neonatalnog perioda (Lakatos i sar., 2015). Pored D-PA i lekovi poput trietilentetraamina, tetratiomolibdata i cinkovih soli poseduju kapacitet za heliranje bakra (Delangle i Mintz, 2012). Zbog uloge koju joni bakra imaju i u brojnim drugim procesima poput angiogeneze, ključnom procesu u rastu tumora i stvaranju metastaza, helatori bakra se ispituju i u pravcu antitumorskog delovanja. Do sada su studije na životinjama pokazale nastanak inhibicije tumorskog rasta nakon primene D-PA (Santini i sar., 2014).

Dosadašnja istraživanja su svakako ukazala na postojanje interakcija BR i Cu^{2+} , ali sama elektrohemijska priroda kao i uticaj pomenutih interakcija na eritrocitne membrane u prisustvu D-PA nije dovoljno objašnjen.

2. CILJEVI RADA

Ciljevi rada su:

- Utvrditi mehanizam redoks interakcija BR i bakra.
- Analizirati redoks interakcije BR i penicilamin-vezanog bakra.
- Analizirati redoks interakcije jona bakra sa β -laktamskim antibioticima (penicilin G, ampicilin, amoksicilin, cefaleksin, cefaklor, ceftriakson, ceftazidim i meropenem).
- Analizirati uticaj jona bakra (Cu^{2+}) na inhibitorne efekte β -laktamskih antibiotika na sojevima *E. coli* i *S. aureus*.

3. MATERIJAL I METODE

Sve analize su urađene na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu; Institutu za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu; Katedri za analitičku hemiju, Hemijskog fakulteta u Beogradu; Laboratoriji za elektron paramagnetnu rezonanciju, Fakulteta za fizičku hemiju u periodu od januara 2016. do juna 2017. godine. Istraživanje je sprovedeno u okviru projekta “Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patologiji”, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj 173014.

Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka broj: 1550/II-5).

3.1. Supstance:

Sve korišćene hemikalije su analitičke čistoće. U eksperimentima je korišćen: bilirubin (>98% čistoće), CuCl_2 , penicilamin, katalaza (CAT; C1345), 1,2-dimiristol-sn-glicero-3-fosfoholin (DMPC), β -laktamski antibiotici (penicilin G, ampicilin, trihidrat; amoksicilin, trihidrat; cefaleksin, monohidrat; cefaklor, monohidrat; ceftazidim, pentahidrat; ceftriakson-dinatrijum, triseskvihidrat; meropenem, trihidrat; standardne čistoće), komponente pufera (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), CuCl (Merck, Kenilworth, SAD), FeCl_3 (Analytika Ltd., Prag, Češka). U svim eksperimentima je korišćena destilovana, dejonizovana voda (18 M Ω).

Štok rastvori bilirubina (1mM, rastvaran u 5 mM NaOH), štok rastvori antibiotika u puferu, CuCl (rastvoren u 1M HCl korišćenjem 1 M NaOH za neutralizaciju kiseline), fosfatni pufer (50 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4), so fosfatnog pufera (10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl; pH 7.4) su spremeni svaki dan i bili su u ledu zaštićeni od svetlosti. Inkubacija i merenja su vršena u mraku na temperature od 293 K, izuzev eksperimenata sa eritrocitima koji su vršeni na 310 K.

Sve analize su urađene kroz odvojene *in vitro* eksperimente pomoću: ultraljubičaste/vidljive spektroskopije, elektron paramagnetne rezonancije (EPR),

ciklične i diferencijalne pulsne voltometrije, merenjem potrošnje kiseonika uz pomoć pulsne kiseonične metode, merenjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), merenjem lipidne peroksidacije i hemolize.

3.2. Biohemijska procedura uzorkovanja krvi

Od pet zdravih dobrovoljaca je uzeto po 5 mL periferne venske krvi pomoću Vakutajner epruveti sa kalijum etilen diamino tetra sirćetnom kiselinom, K₃EDTA, (BD, Franklin Lakes, SAD). Uzorci su centrifugirani (2000 g/10 min/4°C). Izdvojeni eritrociti su tri puta isprani fiziološkim rastvorom 0.9% NaCl i potom tretirani uz pomoć soli fosfatnog pufera. Nakon 5 minuta inkubacije na 310 K uz blago mešanje odvojen je supernatant uz centrifugiranje. Eritrociti su zamrzavani u tečnom azotu, a naknadno čuvani na -80 °C.

3.2.1. Određivanje malondialdehida

Kao produkt lipidne peroksidacije u eritrocitima je određivan nivo malondialdehida. Analiza se zasniva na reakciji malondialdehida sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) u kiselim uslovima (sirćetna kiselina), na temperaturi 100°C pri čemu se stvara ružičasti kompleks nakon čega se čita apsorbanca na 535 nm (Ohkawa i sar., 1979), a koncentracija je izračunata uz pomoć molarog ekstinkcionog koeficijenta $1.56 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ekperimentalni postupak:

Za dobijanje reakcione smeše neophodno je 20 mL sirćetne kiseline i 80 mL destilovane, dejonizovane H₂O, podešavanje vrednosti pH 3.5 uz pomoć NaOH i 1% TBA (8g/L TBA). Napravi se odvojena smeša sa 5 mM TRIS (0.3 g), 1 mM EDTA, 500 mL H₂O, pH 7 vrednost se podešava pomoću HCl. Eritrocitima se dodaje 100 µL EDTA+TRIS smeše i čuva se pola sata, a potom se dodaje 81 g/L SDS (40 µL), vorteksuje se i ponovo stavlja na led. U poslednjem koraku se dodaje 600 µL smeše TBA u sirćetnoj kiselini, vorteksuje, stavlja na temperaturu od 100°C jedan sat. Nakon sat vremena uzorci se stavljaju u kvarcne kivete i čita se apsorbanca.

3.2.2. Određivanje hemoglobina u serumu

U delu lizata je određen nivo hemoglobina pomoću Drabkinove metode (Drabkin i Austin, 1935).

Eksperimentalni postupak:

Drabkinov reagens je fotosenzitivan i sačinjavaju ga 132 mg $K_3Fe(CN)_6$, 130.4 mg KCN, 0.5M KH_2PO_4 (136.09 g/mol), 100 mL H_2O , dok je pH je podešen na 7 uz pomoć NaOH. U epruvete se sipa 1 mL Drabkinovog rastvora i 70 μ L uzorka i potom vorteksuje. Uzorci stoje u mraku 15 minuta, potom se sipaju u kvarcne kivete i analiza se čita na spektrofotometru, korišćenjem apsorbance 545 nm koja je proporcionalna ukupnoj količini hemoglobina.

$$[c] = A_{545} \times 36.77 ; \text{jedinice [g/100mL]}$$

3.3. Ultraljubičasta-vidljiva (UV-VIS) spektroskopija

UV (ultraljubičasto)-VIS (vidljiva) spektroskopija se zasniva na apsorpciji svetlosti u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra. U praksi, UV-VIS spektroskopija pruža informacije o strukturi, geometriji kompleksa, pomaže identifikaciju liganda i daje informacije o interakcijama između metala i liganda. Apsorpcijom zračenja dolazi do prelaza valentnih elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje. Elektronski prelazi se ostvaruju sa vezivnih u antivezivne energetske nivoe.

U našem istraživanju UV-VIS spektroskopija je korišćena u cilju kvantitativnog određivanja jona bakra, opisa hemijskih veza jona bakra, procene stabilnosti i strukture kompleksa jona bakra i BR ili β -laktamskih antibiotika. Analiza se zasniva na praćenju zavisnosti apsorbance od talasne dužine zračenja koje prolazi kroz analiziranu supstancu. Boja rastvora je pod snažnim uticajem prisustva drugih vrsta koje se nalaze u rastvoru, poput liganda i menja se u zavisnosti da li dolazi do stvaranja kompleksa ili razgradnje molekula sa BR i β -laktamskim antibioticima. U tumačenju rezultata je neophodno poznavanje Lamber-Berovog zakona, po kome je apsorbancija direktno

proporcionalna proizvodu koncentracije vrste koja apsorbuje svetlost, dužini optičkog puta i molarnoj apsorptivnosti.

$$A = \log I_0/I_p = \varepsilon \cdot C \cdot L$$

I_0 – intenzitet upadne svetlosti

I_p – intenzitet propuštene svetlosti

ε – konstanta (molarna apsorptivnost)

C – koncentracija supstance koja apsorbuje

L – dužina optičkog puta

Područje merenja spektrofotometra je 800-200 nm; zapremina uzorka 1 mL. Korišćen je aparat 2501 PC Shimadzu (Kyoto, Japan).

Ekperimentalni postupak:

I serija eksperimenata (BR): Vreme skeniranja je 50 s, inicijalno skeniranje 30 s odmah po spremanju uzorka, a potom su reakcije praćene pola sata i snimane na svakih pet minuta. Korišćen je kalijum fosfatni pufer (KPP).

1. 0.1 mM BR u 50 mM KPP pH 7.4
2. 0.2 mM Cu^{2+} u 50 mM KPP 7.4
3. 0.2 mM Fe^{3+} u 50 mM KPP 7.4
4. 0.2 mM BR + 0.2 mM Cu^{2+} u 50 mM KPP pH 7.4
5. 0.2 mM BR + 0.2 mM Fe^{3+} u 50 mM KPP pH 7.4

II serija eksperimenata (β -laktamski antibiotici): vreme skeniranja 50 s, spremeni su sveži uzorci i odmah skenirani, a potom praćeni sat vremena i snimani u 0.5, 10, 20, 30, 40 i 60 minutu.

1. 0.2 mM penicilin G u 50 mM KPP pH 7.4
2. 0.5 mM ampicilin u 50 mM KPP pH 7.4
3. 0.5 mM amoksisicilin u 50 mM KPP pH 7.4
4. 0.2 mM cefaleksin u 50 mM KPP pH 7.4
5. 0.2 mM cefaklor u 50 mM KPP pH 7.4

6. 0.05 mM ceftriakson u 50 mM KPP pH 7.4
7. 0.2 mM ceftazidim u 50 mM KPP pH 7.4
8. 0.1 mM meropenem u 50 mM KPP pH 7.4
9. 0.05 mM Cu²⁺ u 50 mM KPP pH 7.4
10. 0.1 mM Cu²⁺ u 50 mM KPP pH 7.4
11. 0.2 mM Cu²⁺ u 50 mM KPP pH 7.4
12. 0.5 mM Cu²⁺ u 50 mM KPP pH 7.4
13. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM penicilin G u 50 mM KPP pH 7.4
14. 0.5 mM Cu²⁺ + 0.5 mM ampicilin u 50 mM KPP pH 7.4
15. 0.5 mM Cu²⁺ + 0.5 mM amoksisicilin u 50 mM KPP pH 7.4
16. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM cefaleksin u 50 mM KPP pH 7.4
17. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM cefaklor u 50 mM KPP pH 7.4
18. 0.05 mM Cu²⁺ + 0.05 mM ceftriakson u 50 mM KPP pH 7.4
19. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM ceftazidim u 50 mM KPP pH 7.4
20. 0.1 mM Cu²⁺ + 0.1 mM meropenem u 50 mM KPP pH 7.4

3.4. Oksimetrija

Potrošnja kiseonika u interakcijama između jona bakra i bilirubina, kao i između jona bakra i β -laktamskih antibiotika je izmerena pomoću Klarkove kiseonične elektrode (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, UK) korišćenjem programa Lab Pro i Logger Pro 3 softvera (Vernier, Beaverton, SAD). U cilju određivanja osnovne koncentracije kiseonika, uzorci su praćeni i snimani 2-5 minuta pre dodavanja BR, odnosno β -laktamskih antibiotika u drugoj seriji eksperimenata. Nakon praćenja smanjenja koncentracije kiseonika, dodata je CAT u cilju određivanja koncentracije vodonik peroksida (H₂O₂). Aktivnost katalaze: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Mojić i sar., 2014).

Eksperimentalni postupak:

I serija eksperimenata (BR): Promene u koncentraciji kiseonika su praćene 10 minuta pa je dodato 200 IU CAT u cilju određivanja koncentracije H₂O₂.

1. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.1 mM BR u 50 mM KPP pH 7.4
2. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM BR u 50 mM KPP pH 7.4
3. 0.4 mM Cu²⁺ + 0.2 mM BR u 50 mM KPP pH 7.4
4. 0.8 mM Cu²⁺ + 0.2 mM BR u 50 mM KPP pH 7.4
5. 0.8 mM Cu²⁺ u 50 mM KPP pH 7.4
6. 0.2 mM BR u 50 mM KPP pH 7.4
7. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM PA u 50 mM KPP pH 7.4
8. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM PA + 0.2 mM BR u 50 mM KPP pH 7.4

II serija eksperimenata (β -laktamski antibiotici): Promene u koncentraciji kiseonika su praćene 30 minuta, a potom je dodato 100 IU/mL CAT.

1. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM penicilin G u 50 mM KPP pH 7.4
2. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM ampicilin u 50 mM KPP pH 7.4
3. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM amoksicilin u 50 mM KPP pH 7.4
4. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM cefaleksin u 50 mM KPP pH 7.4
5. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM cefaklor u 50 mM KPP pH 7.4
6. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM cefaklor u 50 mM KPP pH 7.4
7. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM ceftriakson u 50 mM KPP pH 7.4
8. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM ceftazidim u 50 mM KPP pH 7.4
9. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM meropenem u 50 mM KPP pH 7.4

3.5. Elektron paramagnetna rezonancija

Elektron paramagnetna rezonancija (EPR) detektuje proces rezonantne apsorpcije mikrotalasnog zračenja u sistemu sa najmanje jednim nesparenim elektronom i korišćena je u cilju ispitivanja kompleksa jona bakra sa bilirubinom i β -laktamskim antibioticima. Danas se smatra da EPR predstavlja zlatni standard u redoks ispitivanjima i predstavlja nedestruktivnu spektroskopsku tehniku (Hagen, 2008). Sistemi sa nesparenim elektronom poseduju magnetni momenat i daju EPR signal te se s toga

koristi u brojnim granama poput biologije, fizike, hemije (Gala i sar., 2014). Cu^{2+} je EPR aktivan jer poseduje 9 valentnih elektrona (d orbitala) od kojih je jedan nesparen, pa je EPR označen kao metoda izbora za ispitivanje kompleksa jona bakra (Rosenzweig, 2009). Analizom EPR rezultata dobija se uvid u strukturu, karakteristike, orijentaciju i dinamiku kompleksa Cu^{2+} . Analizom geometrije kompleksa na direktni i laki način dobijamo informacije o energetskim nivoima d orbitala i o osnovnom stanju jona bakra koji je učestvovao u reakciji (Garribba i Micera, 2006).

Princip rada EPR-a se zasniva na činjenici da kada atom ili molekul poseduju elektronski ugaoni momenat, J (zbir orbitalnog, L , i spinskog, S , ugaonog momenta) poseduje i magnetni momenat, μ . Pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja, B (u kojem se nalazi uzorak), nastaje takozvani Zemanov efekat, $2J+1$ energetskih nivoa. Između Zemanovih nivoa se odigravaju prelazi indukovani apsorpcijom kvanta zračenja čija se energija poklapa sa razlikom u energijama nastalih nivoa. Bez spoljašnjeg magnetnog polja nivoi su istih energija i prelaz nije moguć. U spoljašnjem magnetnom polju vrednosti za spinski magnetni momenat, μ_S , se kvantifikuju i određene su ukupnim spinskim magnetnim brojem M_S , tako da postoji $2S + 1$ dozvoljenih vrednosti za M_S (od $-S$ do $+S$), odnosno $2S+ 1$ dozvoljenih spinskih nivoa (Spasojević, 2011). EPR registruje energiju apsorpcije pošto je veći broj nesparenih elektrona na nižem energetskom nivou (Hagen, 2006).

$$h\nu = g \mu_B B$$

h – Plankova konstanta

ν – frekvencija mikrotalasnog zračenja

g – g faktor

μ_B – Borov magneton

Pet parametara definiše EPR signal: g faktor, intenzitet, širina, hiperfino i fino cepanje rezonantne linije. Sam EPR signal je dobijen održavanjem konstantne mikrotalasne frekvencije dok se kontinualno menja spoljašnje magnetno polje. Izvor monohromatskog mikrotalasnog zračenja je klistron, a vrednost spoljašnjeg magnetnog polja se menja linearno u rezonatoru u kojem se nalazi uzorak. Rezonancija dovodi do apsorpcije energije mikrotalasa što uzrokuje promenu detektorske struje. Detektor je

uređaj na bazi poluprovodnika koji konvertuje mikrotalase u jednosmernu struju. Sam položaj EPR linije se navodi kao g -vrednost koja se često naziva otiskom molekula (Hagen, 2006). Intenzitet rezonantne linije je proporcionalan koncentraciji nesparenih elektrona koji daju EPR spektar. Na širinu rezonantne linije utiču spin-spin interakcije i spin-rešetka interakcije. Hiperfina interakcija je interakcija nesparenog elektrona sa jezgrom koje se nalazi u njegovoj blizini (Hagen, 2009).

U našem istraživanju je korišćen Bruker Elexsys II spektrometar, intenzitet spoljašnjeg magnetnog polja se merio u X oblasti (9.4 GHz), temperatura (110 K) je održavana pomoću Bruker N₂ kontrolnog sistema ER4131VT. Nekoliko je razloga koji objašnjavaju zašto se EPR snimanja rade na niskim temperaturama. Jedan od razloga snimanja na nižim temperaturama je prevazilaženje mogućnosti apsorpcije dela mikrotalasnog zračenja koje nastaje prilikom korišćenja vodenih rastvarača. Takođe, teorijski najjači signal se dobija pri nižim temperaturama. Razlika između dva energetska nivoa $S=-1/2$ i $S=1/2$ je veoma mala pri sobnoj temperaturi i tek se pri nižim temperaturama postiže dovoljna razlika koja kreira signal.

Eksperimentalni parametri su bili: mikrotalaska snaga 3.17 mW; vreme skeniranja 80 s za seriju eksperimenata sa bilirubinom, 100 s za seriju eksperimenata sa β -laktamskim antibioticima; modulaciona amplituda 0.5 mT; modulaciona frekvencija 100 kHz; broj akumulacija 4. Svi spektri su korigovani u odnosu na početni nivo. Uzorci su stavljeni u kvarcne kivete (Wilmaad-LabGlass, Vineland, NJ, USA).

Eksperimentalni postupak:

I serija eksperimenata (BR): 1,2-dimiristolil-sn-glicero-3-fosfolin (DMPC; 62.5 mg/mL konačne koncentracije lipida) je spremljen u vodi prema prethodno definisanom protokolu (Rangel i sar., 2014). Priprema lipozoma se sastojala u sušenju lipidnog rastvora DMPC u hloroformu pomoću struje argona. Organski rastvarač se uklonio isparavanjem pod vakuumom tokom tri sata. Dobijene osušene lipidne folije su dispergovane sa 10 mM puferom 3-N-mofrolino-propan-sulfonske kiseline (0.1 NaCl, pH 7.4), a mešavina je vorteksovana na temperaturi višoj od faze tranzicije (310 K) u cilju dobijanja višeslojnih lipozoma. Nakon toga, višeslojni lipozomi su prošli pet puta sledeći ciklus: vezikule su zamrznute u tečnom azotu, a uzorak je odmrznut u vodenom kupatilu na 37°C. Suspenzije lipida su uravnotežene na 37°C tokom 30 minuta i deset

puta provučene kroz polikarbonatne filtere (100 nm) kako bi se dobile velike unilamelarne vezikule (Rangel i sar., 2014). Uzorci su stavljeni u kvarcne EPR kivete i brzo zamrzavani u izopentanu nakon 30 sekundi inkubacije.

Vreme inkubacije Cu^{2+} i BR je 5 minuta.

1. 0.2 mM Cu^{2+} u 50 mM KPP 7.4
2. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM BR u 50 mM KPP 7.4
3. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM PA u 50 mM KPP 7.4
4. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM PA + 0.2 mM BR u 50 mM KPP 7.4
5. 0.2 mM Cu^{2+} + 62.5 mg/mL DMPC u H_2O
6. 0.2 mM Cu^{2+} + 62.5 mg/mL DMPC + 0.2 mM BR u H_2O

II serija eksperimenata (β -laktamski antibiotici): Nakon stavljanja u kvarcne EPR kivete uzorci su zamrzavani nakon 5 minuta inkubacije. Koncentracija bakra je bila 0.2 mM, koncentracija β -laktamskih antibiotika 0.2 mM i 0.4 mM u 50 mM KPP, pH 7.4.

1. 0.2 mM Cu^{2+} u 50 mM KPP 7.4
2. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM penicilin G u 50 mM KPP 7.4
3. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM ampicilin u 50 mM KPP 7.4
4. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM amoksicilin u 50 mM KPP 7.4
5. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM cefaleksin u 50 mM KPP 7.4
6. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM ceftriakson u 50 mM KPP 7.4
7. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.2 mM ceftazidim u 50 mM KPP 7.4
8. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.4 mM penicilin G u 50 mM KPP 7.4
9. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.4 mM ampicilin u 50 mM KPP 7.4
10. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.4 mM amoksicilin u 50 mM KPP 7.4
11. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.4 mM cefaleksin u 50 mM KPP 7.4
12. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.4 mM ceftriakson u 50 mM KPP 7.4
13. 0.2 mM Cu^{2+} + 0.4 mM ceftazidim u 50 mM KPP 7.4

3.6. Ciklična i diferencijalna pulsna voltametrija

Voltametrijske metode omogućavaju direktno i brzo merenje redoks osobina i pružaju informacije o kinetici transfera elektrona (Armstrong i sar., 1997). Voltametrijske metode se zasnivaju na promeni potencijala stacionarne radne elektrode sa vremenom i merenja odgovarajuće struje koja se javlja kao posledica redoks procesa. Voltametrijska analiza je urađena pomoću potenciostata/galvanostata CHI 760b (CHI Instruments Inc., Austin, TX, SAD), koji je bio kontrolisan preko odgovarajućeg elektrohemijskog softvera. Radna elektroda (mikroelektroda čiji se potencijal menja vremenom) je dijamantska elektroda dopirana borom, koja se nalazi u polimeru (polyether ether ketone), dijametra 3 mm, rezenzitivnost $0.075 \Omega \text{ cm}$, nivo dopiranja borom od 1000 ppm (Windsor Scientific Ltd., Slough, UK). Kao referentna elektroda, čiji potencijal ostaje konstantan, korišćena je srebro/srebro hloridna elektroda i sastoji se od srebrne žice uronjene u rastvor srebra hlorida, a kao elektrolit je korišćen rastvor KCl (3 M). Platinska elektroda velike površine je korišćena kao pomoćna elektroda. Pomoćna elektroda vodi elektron od izvora signala kroz rastvor do radne elektrode i sprečava polarizaciju radne elektrode. Brzina skeniranja je 0.1 V/s .

Ciklična voltametrija (CV) se često koristi u cilju opisa elektrohemijski aktivnih sistema. Sastoji se iz reverzne, linearne promene elektrodnog potencijala od početnog potencijala do vrednosti krajnjeg potencijala i vrednosti potencijala gašenja. Sam elektrohemijski sistem se snima u širokom opsegu potencijala. Promenom potencijala preko karakterističnog potencijala redoks procesa nastaje strujni vrh, nakon čega dolazi do pada u jačini struje zbog smanjenja koncentracije analita u blizi elektrode. U našem istraživanju su od interesa intenzitet pikova struje za anodni i katodni proces i_{pa} i i_{pc} i potencijalni za iste procese E_{pa} i E_{pc} . Potencijal vrha je vrednost karakteristična za svaki spoj i korelira sa njegovom sposobnošću da primi ili otpusti elektrone. Najvažnija informacija koju pruža CV je upravo potencijal na kome dolazi do redukcije odnosno oksidacije, a koje se formiranjem kompleksa može izmeniti. Promena potencijala je obično reverzna za specifični potencijal gašenja pa otuda i ime CV. Korišćenjem CV možemo na brzi i lak način, pomoću jednog eksperimenta dobiti informacije o koncentraciji, difuzionom koeficijentu, broju elektrona koji je oksidovan/redukovan i/ili redoks potencijalu ispitivane supstance. U našem istraživanju je primenjena u cilju

ispitivanja redoks potencijala bakra u prisustvu BR kao i u prisustvu antibiotika i praćen je proces oksidacije, od viših ka nižim potencijalima.

Eksperimentalni postupak:

I serija eksperimenata (BR): Prilikom elektrohemijskog merenja cikličnom voltametrijom korišćena je voda, pH ~ 5.5 (podešen pomoću 100mM HCl). Merenje je izvršeno odmah nakon pripreme uzorka.

1. 0.1 mM CuCl u H₂O
2. 0.4 mM CuCl₂ u H₂O
3. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM BR u H₂O

Pulsna voltametrija je korišćena u cilju određivanja stehiometrijskog odnosa bilirubinom redukovano bakra na istom aparatu. Pulsna voltametrija se zasniva na metodu stepenica, odnosno sukcesivnom povećanju potencijalskih koraka različite visine u pozitivnom i negativnom smeru što uzrokuje nastanak struje. Između svakog koraka (vrednosti nametnutog potencijala) se pravi pauza. To omogućava da se vrste koje su nastale uz elektrodu udalje od iste difuzijom, pa dobijene struje potiču isključivo od molekula u rastvoru, a ne od onih koje su generisane reakcijama na elektrodi. Visina pika i_p je proporcionalna koncentraciji analita i određena je amplitudom ΔE_A pulsa pravougaonih talasa kao i vremenom trajanja pulsa. Prednosti metode su što se pojedinačni maksimum krive može dobiti za supstance sa polutalasnim potencijalom koji se razlikuje 0.04 V – 0.05 V, kao i granica detekcije od $\sim 10^{-8}$ što je čini dovoljno osetljivom. U našem istraživanju je primenjena najefikasnija pulsna metoda odnosno diferencijalna pulsna voltametrija. Kod ove tehnike meri se razlika između dve struje, prva se meri odmah po završetku zadavanja pulsa, a druga nakon nekoliko milisekundi pre početka zadavanja pulsa. Uslovi tokom pulsne voltametrije: početni potencijal elektrode 0.5 V, krajnji -0.5 V; povećanje 0.004 V; amplituda 0.05 V; širina pulsa 0.05 s; širina pika 0.01 s; vreme odgovora 2 s.

4. 0.4 mM Cu²⁺ + 0.2 mM BR u H₂O
5. 0.4 mM Cu²⁺ u H₂O

6. 0.3 mM Cu²⁺ u H₂O

7. 0.2 mM Cu²⁺ u H₂O

II serija eksperimenata (β-laktamski antibiotici): Tokom CV i β-laktamskih antibiotika je korišćen KPP, pH 7.4.

1. 0.5 mM Cu²⁺ u 50 mM KPP 7.4

2. 2 mM Cu²⁺ u 50 mM KPP 7.4

3. 2 mM Cu²⁺ + 2 mM penicilin G u 50 mM KPP pH 7.4

4. 2 mM Cu²⁺ + 2 mM ampicilin u 50 mM KPP pH 7.4

5. 2 mM Cu²⁺ + 2 mM amoksicilin u 50 mM KPP pH 7.4

6. 2 mM Cu²⁺ + 2 mM cefaleksin u 50 mM KPP pH 7.4

7. 2 mM Cu²⁺ + 2 mM ceftriakson u 50 mM KPP pH 7.4

8. 2 mM Cu²⁺ + 2 mM ceftazidim u 50 mM KPP pH 7.4

9. 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM cefaklor u 50 mM KPP pH 7.4

10. 2 mM Cu²⁺ + 2 mM cefaklor u 50 mM KPP pH 7.4 (praćen pet minuta)

11. 0.5 mM meropenem u 50 mM KPP 7.4

12. 0.5 mM Cu²⁺ + 0.5 mM meropenem u 50 mM KPP 7.4

3.7. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Kao parameter antimikrobne aktivnosti antibiotika određivana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). MIK je najniža koncentracija antibiotika pri kojoj nakon 24h inkubacije nema vidljivog rasta mikroorganizma. Antibakterijska aktivnost uzoraka je ispitivana na bakterijama tipskih sojeva iz *American Type Culture Collection*: *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Agarne ploče (Torlak, Beograd, Srbija) su pripremane sa antibioticima ili antibioticima sa ekvimolarnom koncentracijom Cu²⁺. Rastvori su spremni pomoću 0.9% NaCl i hranljive podloge (v/v 1:9). Koncentracije antibiotika nakon dvostrukih razblaženja su bile: 6.25, 12.5, 25, 50, 62.5, 125, 250, 500 i 1000 µg/mL. Korišćene su mikrotitar ploče. Mikrotitar ploče su inkubirane 24h na 37°C. Nakon zasejavanja iste zapremine

tečne kulture na agarnu ploču i inkubacije, brojane su kolonije. Bakterijski inokulum je bio u opsegu 50-200 CFU. Eksperimenti su ponovljeni 3 puta.

3.8. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, izuzev eksperimenata sa eritrocitima koji su ponovljeni 5 puta. Podaci su kvantitativno opisani uz pomoć srednje vrednosti \pm S.D (standardna devijacija). U cilju obrade podataka i definisanja postojanja statistički značajne razlike ($p < 0.05$) korišćene su odgovarajuće statističke analize. U radu je korišćen neparametarski test Mann Whitney za obradu dva nezavisna uzorka koji nemaju normalnu raspodelu. Takođe primenjena je i jednofaktorska analiza varijansi (one-way ANOVA) sa *post hoc* Dankanovim testom u cilju utvrđivanja statistički značajnih razlika između više grupa (> 2) u jednoj varijabli.

Rezultati su predstavljeni odgovarajućim tabelarnim i grafičkim prikazima. Za teorijsko-analitički deo rada korišćena je strana i domaća, naučna i stručna literatura.

Baza podataka i analiza rezultata izvršena je pomoću softverskog paketa SPSS 10.0 (SPSS, Inc, Chicago, SAD).

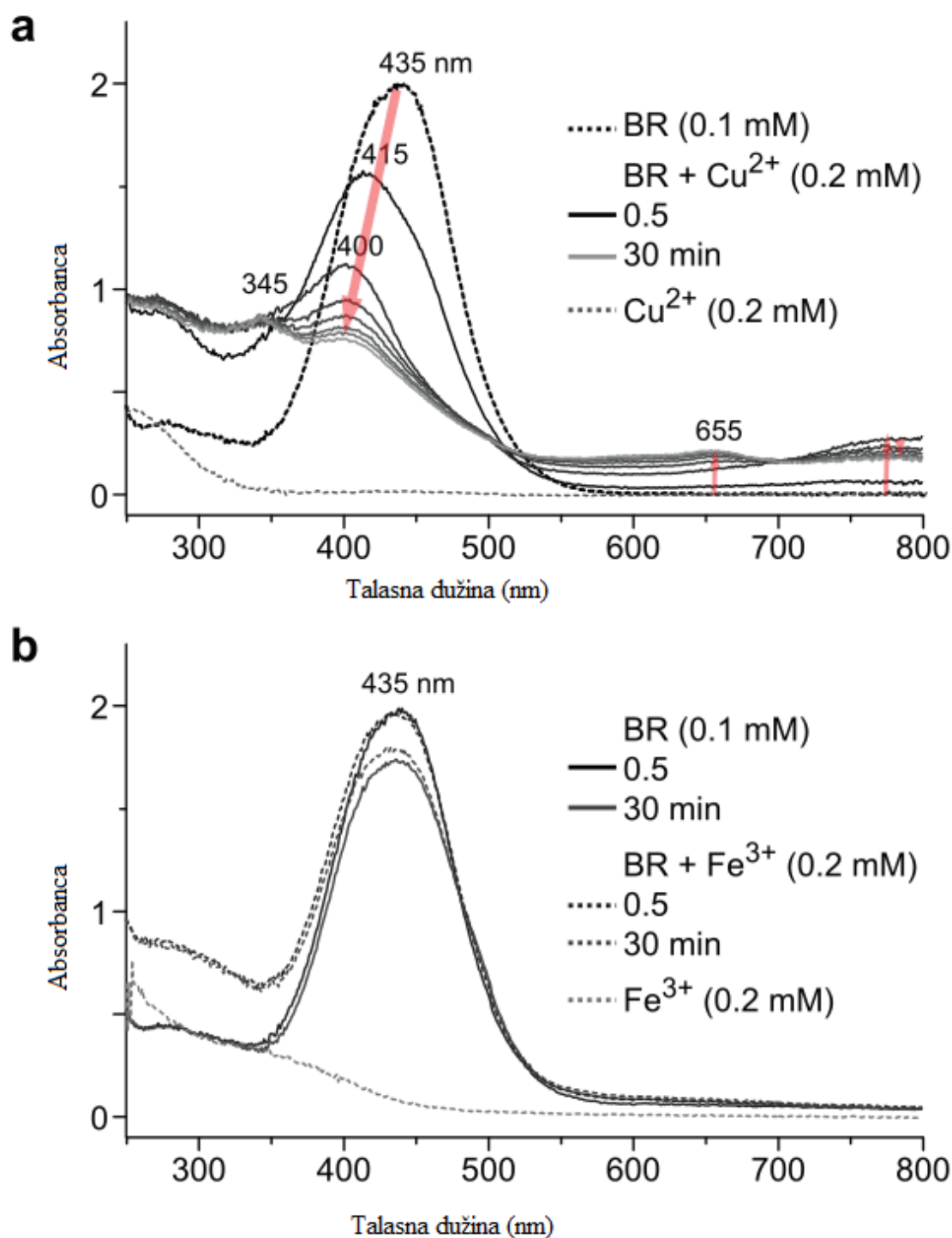
4. REZULTATI

4.1. Bilirubin i Cu^{2+}

4.1.1. UV-VIS spektroskopija

Da bi se ispitalo stvaranje kompleksa ili degradacija u sistemu Cu^{2+} -BR urađena je spektrofotometrijska analiza promene apsorbance rastvora u funkciji vremena u opsegu talasnih dužina 200-800 nm. Prilikom praćenja reakcije između BR i Cu^{2+} uočeno je smanjenje apsorbance u odnosu na početnu, pomeranje maksimalne apsorbance od 415 nm (0.5 minuta) ka 400 nm (30 minuta) kao i pojava dodatnog pika ($\lambda=330$ nm). Tokom vremena praćenja zabeleženo je opadanje apsorbance sa pojavom porasta apsorbance na 655 nm (Slika 3a). Opaženi rezultati govore u prilog bakrom indukovane degradacije BR.

Tokom snimanja spektra samog spektra BR u vremenu dobijen je očekivani rezultat ($\lambda= 435$ nm). Tokom posmatranja spektra samog BR uočava se blago smanjenje u intenzitetu spektra, što se može pripisati foto-degradaciji. Slični rezultati su dobijeni i analizom ponašanja BR u prisustvu Fe^{3+} (Slika 3b).

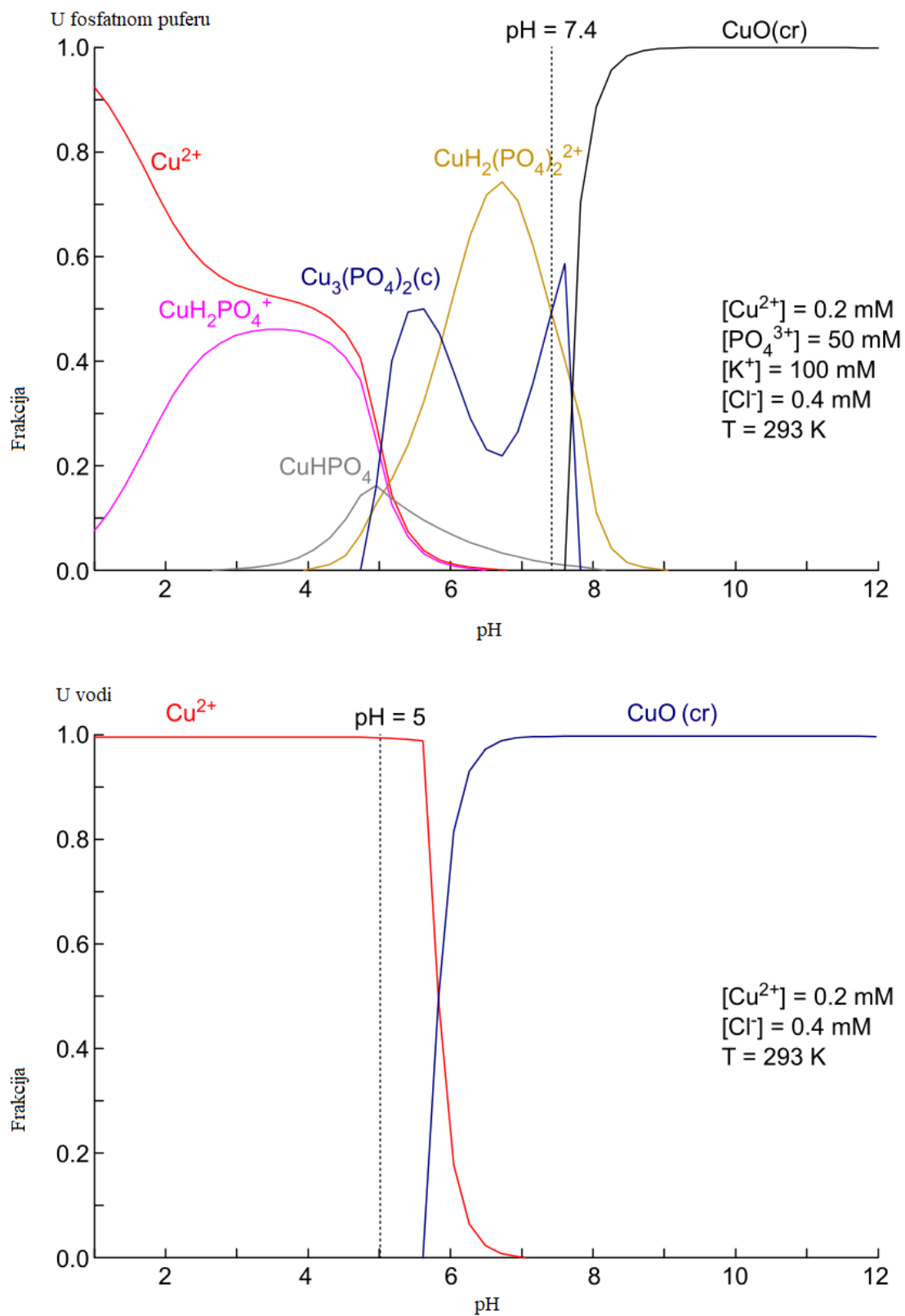


Slika 3. UV-VIS spektar bilirubina u odsustvu ili prisustvu (a) Cu²⁺ ili (b) Fe³⁺ u 50 mM fosfatnom puferu pri pH 7.4. (a) UV-VIS spektar 0.1 mM BR u prisustvu 0.2 mM Cu²⁺ tokom 30 minuta (snimanje na svakih 5 minuta). Promene su označene strelicom. (b) UV-VIS spektri 0.1 mM BR tokom 30 minuta bez i sa Fe³⁺.

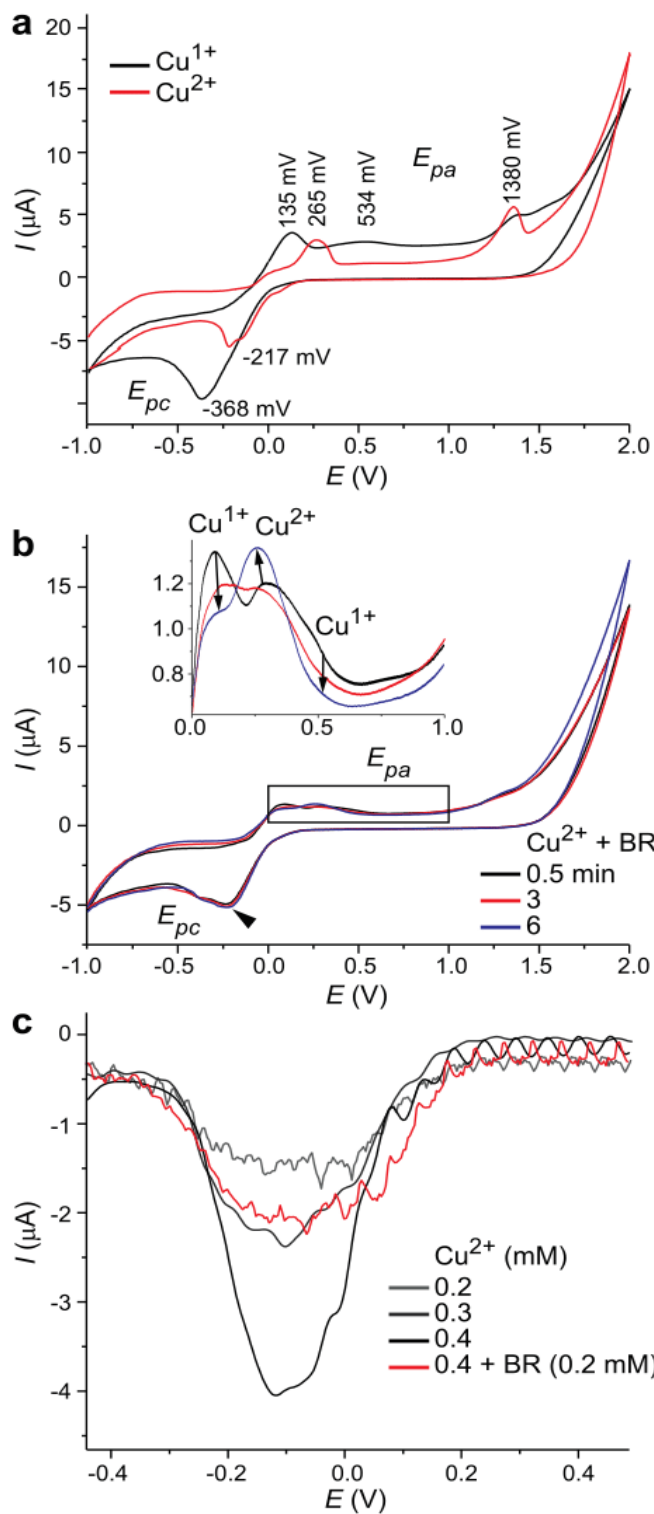
4.1.2. Ciklična i diferencijalna pulsna voltametrija

Za eksperimente na cikličnoj voltametriji je korišćena voda kao rastvarač (pH~5) jer su promene u struji koje nastaju pod dejstvom bakra na cikličnoj voltametriji smanjene u fosfatnom puferu. Uzrok ovome je formiranje slabo rastvornih kompleksa sa fosfatnim jonima, dok u vodi Cu^{2+} na pH = 5 postoji kao slobodan jon (Slika 4). Na slici 5a je prikazana potpuna rastvorljivost Cu^{2+} u vodi (pH~5), što nije slučaj kada se koristi fosfatni pufer. Cu^{2+} i Cu^{1+} imaju različite strujne pikove (i_p) anodnog i katodnog potencijala (slika 5a). Slabiji strujni pikovi su zabeleženi u sistemu BR sa Cu^{2+} (slika 5b). Glavne razlike u i_p ova dva sistema su za Cu^{2+} $E_{pa} = 265$ mV i $E_{pc} = -217$ mV i za Cu^{1+} $E_{pa} = 135$ mV i $E_{pc} = 534$ mV. Praćenjem struja Cu^{1+} uočava se vremenski zavisno opadanje koje je praćeno porastom Cu^{2+} struja.

U cilju određivanja stehiometrijskog odnosa BR izazvane redukcije Cu^{2+} primenjena je pulsna voltametrija (slika 5c). Korišćenjem kalibracione krive uočava se da je koncentracija preostalog Cu^{2+} u sistemu 0.4 mM Cu^{2+} i 0.2 mM BR, 0.25 ± 0.04 mM.



Slika 4. Ponašanje Cu^{2+} u fosfatnom puferu vs vodi, pH 7.4. Simulacija urađena u programu Hydra-Medusa; parametri za simulaciju su dati na slici.



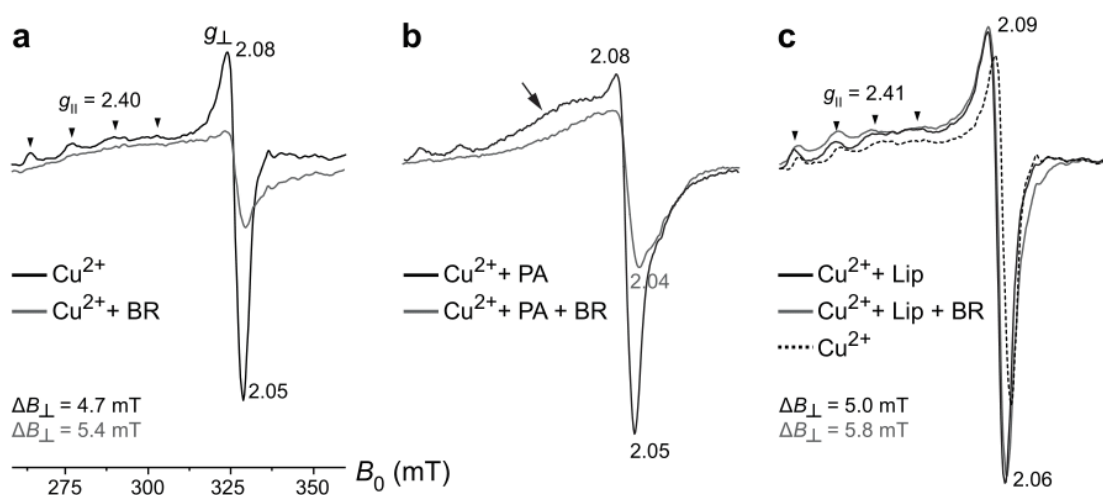
Slika 5. Ciklična i diferencijalna pulsna voltametrija Cu²⁺ i BR u vodi, pH~ 5.5. (a) 0.1 mM CuCl i 0.4 mM CuCl₂; (b) 0.2 mM Cu²⁺ + 0.2 mM BR; (c) pulsna voltametrija Cu²⁺ u različitim koncentracijama i 0.2 mM BR

4.1.3. EPR analiza

Uzimajući u obzir da je EPR metoda izbora za ispitivanje Cu^{2+} kompleksa na slici 6 je predstavljen karakterističan EPR spektar Cu^{2+} sa aksijalnom simetrijom jake g_{\perp} linije i četiri slabe linije g_{\parallel} ($g_{\parallel}=2.40$) koje nastaju nakon hiperfinog cepanja rezonantne linije $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ ($I=3/2$). U prisustvu BR intenzitet signala se značajno smanjuje (Slika 6a). Uprkos smanjenju signala prisutnost Cu^{2+} se i dalje očitava, što se može objasniti činjenicom da je deo Cu^{2+} vezan za fosfatni pufer i ne podleže razgradnji u prisustvu BR (slika 6). U prisustvu BR, Cu^{2+} signal poseduje šire g_{\perp} i ne dolazi do hiperfinog cepanja.

Kada se analizira sistem Cu^{2+} i PA uočava se širi signal PA-vezanog Cu^{2+} i signal Cu^{2+} u fosfatnom puferu (slika 6b). Inkubacija sa BR je uticala na smanjenje signala slobodnog Cu^{2+} , sa minimalnim uticajem na Cu^{2+} -PA kompleks.

DMPC lipozomi su korišćeni kao model membrana, a rezultati su prikazani na slici 6c. Lipozomi su korišćeni kao model membrana jer je od ranije poznato da mogu da vezuju Cu^{2+} (Marsh, 2013). Signal Cu^{2+} u prisustvu lipozoma je sličan kao signal Cu^{2+} u fosfatnom puferu, dok se u prisustvu BR signal ne menja značajnije, ali se opaža širenje g_{\perp} linije.



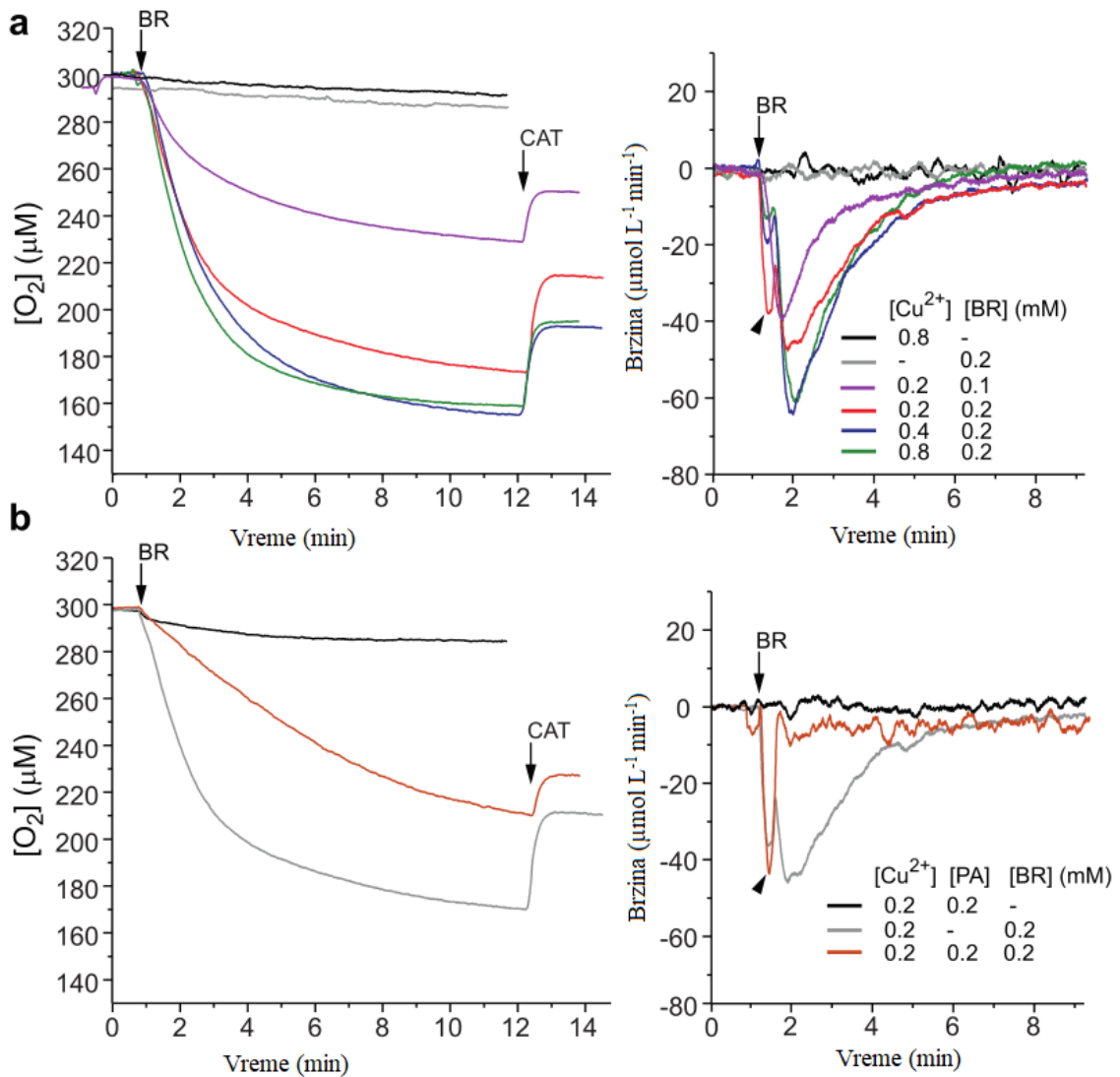
Slika 6. EPR spektri Cu^{2+} u odsustvu i prisustvu bilirubina, penicilamina, lipozoma. (a) 0.2 mM Cu^{2+} i 0.2 mM BR u 50 mM fosfatnom puferu, pH 7.4. ΔB_{\perp} - širina g_{\perp} signala pre i posle inkubacije sa BR. Strelicama su označene četiri linije

nastale od hiperfinog cepanja duž g_{\parallel} (b) 0.2 mM Cu^{2+} i 0.2 mM penicilamina u odsustvu ili prisustvu 0.2 mM BR. Strelicom je označeno širenje signala penicilamin vezanog Cu^{2+} . (c) Cu^{2+} i lipozomi; Cu^{2+} i lipozomi i BR u vodi. Istačkana linija: 0.2 mM Cu^{2+} u fosfatnom puferu.

4.1.4. Oksimetrija

U cilju opisa stehiometrijskog odnosa i uloge kiseonika u redoks reakcijama između BR i Cu^{2+} primenjena je oksimetrija. Nakon dodatka BR rastvoru Cu^{2+} u fosfatnom puferu, uočava se značajan pad u koncentraciji kiseonika (Slika 7a). Na slici je prikazana potrošnja kiseonika pri različitim molarnim odnosima $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}]$, pri čemu se uočava samo blago povećanje u potrošnji kiseonika sa porastom pomenutog odnosa: $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] > 1$ u poređenju sa $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] = 1$ ($142 \pm 4 \mu\text{M}$ vs. $129 \pm 11 \mu\text{M}$; $p > 0.05$). Potrošnja kiseonika nastala u sistemu $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] = 0.5$ je jednaka polovini potrošnje kiseonika u sistemu $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] = 1$. Sve ovo ukazuje da tranzientni kompleks BR/Cu^{2+} reaguje sa molekulskim kiseonikom u 1:1 stehiometriji. Da bi detaljnije ispitali ulogu helatora bakra, u sistem je dodat penicilamin. Na Slici 7b je prikazano značajno smanjenje potrošnje kiseonika nakon uvođenja penicilamina u sistem $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] = 1$ ($80 \pm 15 \mu\text{M}$; $p = 0.040$).

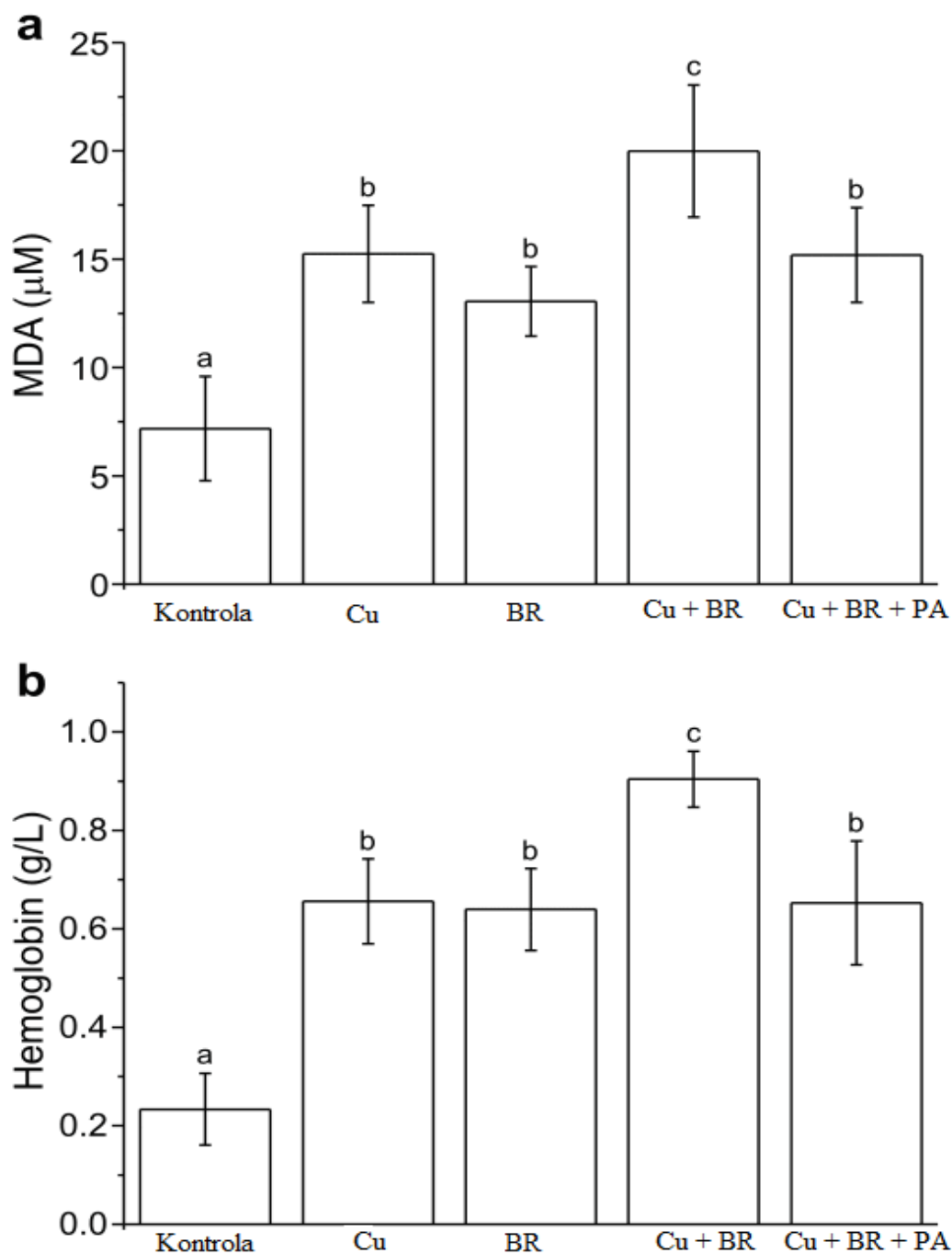
U sve ispitivane sisteme je nakon 10 minuta praćenja dodata CAT i potom praćena koncentracija nastalog H_2O_2 . U sistemu 0.2 mM $\text{Cu}^{2+}/0.2$ mM BR nastala koncentracija H_2O_2 je iznosila $69 \pm 17 \mu\text{M}$, dok je u sistemu 0.2 mM $\text{Cu}^{2+}/0.2$ mM PA/0.2 mM BR nastalo duplo manje H_2O_2 , $33 \pm 11 \mu\text{M}$; $p = 0.044$. Analizom Slike 7a i Slike 7b uočava se da se određena koncentracija kiseonika gubi uprkos dodavanju CAT. Ovi rezultati ukazuju da je došlo do akumulacije H_2O_2 , dok je deo elektrona iz sistema BR/Cu^{2+} "završio" u drugim hemijskim reakcijama/redoks vrstama, npr. hidroksil radikalu, koje se ne mogu detektovati na ova način.



Slika 7. Potrošnja kiseonika u različitim molarnim sistemima BR- Cu²⁺ u 50 mM fosfatnom puferu, pH 7.4. (a) Promene u koncentraciji i potrošnji kiseonika u različitim molarnim sistemima BR- Cu²⁺. (b) Efekat 0.2 mM penicilamina na potrošnju kiseonika u BR- Cu²⁺.

4.1.5. Lipidna peroksidacija i hemoliza

Na Slici 8a se može uočiti efekat BR- Cu^{2+} sistema na humanim eritrocitima, a na Slici 8b i efekat PA u pomenutom sistemu. Analizom rezultata se uočava da pojava lipidne peroksidacije i hemolize u sistemu Cu^{2+} kao i u sistemu BR; MDA u sistemu Cu^{2+} $\sim 15 \mu\text{M}$, u sistemu BR $\sim 13 \mu\text{M}$, u sistemu BR- Cu^{2+} $\sim 20 \mu\text{M}$, u sistemu Cu^{2+} -BR-PA $\sim 15 \mu\text{M}$. Primenjena koncentracija BR je približna koncentraciji koja se nalazi u fiziološkim uslovima u humanoj plazmi (Brodersen i Stern, 1980). Statistički značajno veće oštećenje eritrocita i veća produkcija MDA je opažena u sistemu Cu^{2+} zajedno sa BR (ekvimolarni odnos; $10 \mu\text{M}:10 \mu\text{M}$) (jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Dankanovim testom $p < 0.05$). Na slikama 8a i 8b se uočava da primena PA smanjuje oštećenje ali markeri lipidne peroksidacije i hemolize su i dalje povišeni u odnosu na kontrolne vrednosti.

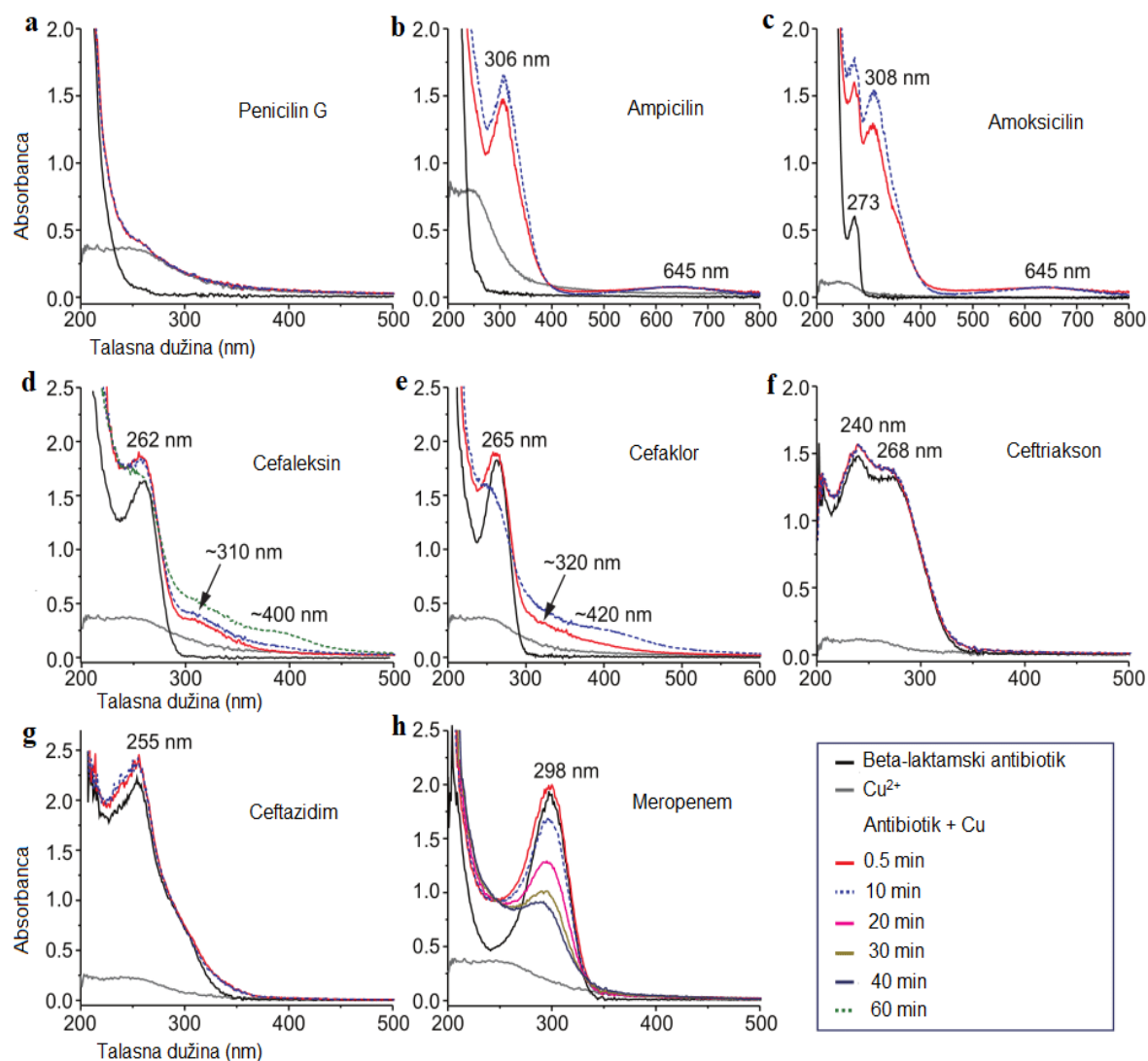


Slika 8. Efekti 10 μM BR i 10 μM Cu^{2+} na eritrocite u odsustvu ili prisustvu 20 μM penicilamina (nakon 5 minuta inkubacije, 37°C, fosfatni pufer, pH 7.4). (a) Ekstracelularna koncentracija MDA, markera lipidne peroksidacije. (b) Ekstracelularna koncentracija hemoglobina, markera hemolize. Stubići označeni slovom b i c predstavljaju statistički značajnu razliku ($p < 0.005$; jednofaktorska analiza varijansi, *post hoc* Duncan's test).

4.2. β -laktamski antibiotici i bakar

4.2.1. UV-VIS spektroskopija

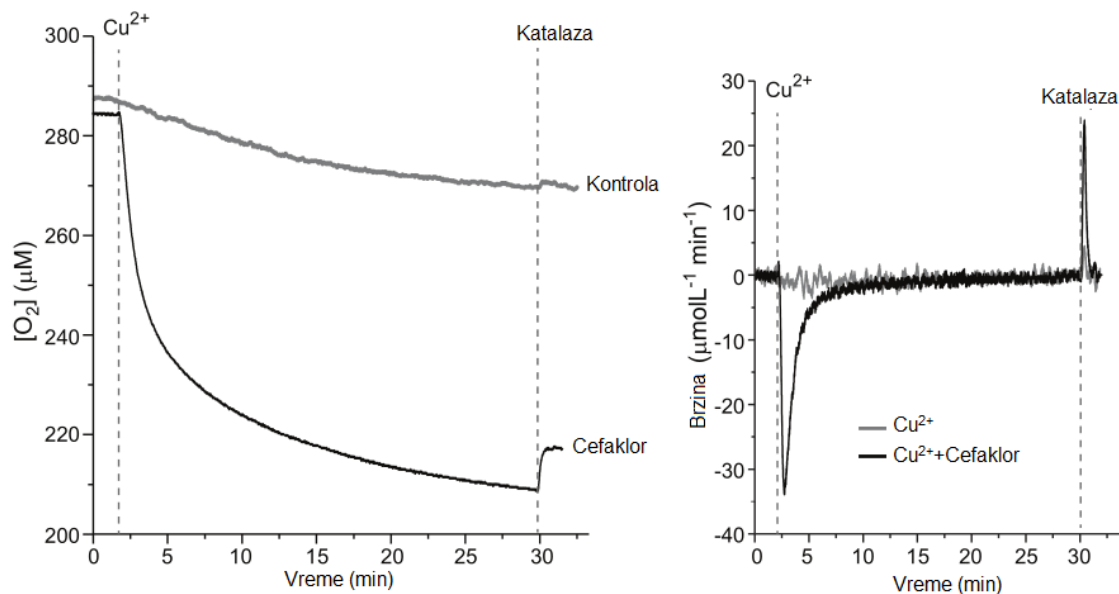
Na Slici 9 su prikazani spektri ispitivanih β -laktamskih antibiotika sa ili bez Cu^{2+} . Tokom 60 minuta praćenja spektar penicilina G se nije promenio u prisustvu Cu^{2+} . Sličan spektar je zabeležen kod ampicilina i amoksicilina. Kod oba pomenuta antibiotika opaža se apsorbanca na ~ 310 nm (306 nm i 308 nm) i apsorbanca slabijeg intenziteta na 645 nm. U slučaju amoksicilina, λ_{max} na 273 nm se nije promenila u prisustvu jona bakra. U slučaju cefaleksina i cefaklora opaža se λ_{max} na ~ 310 nm, ali i nestanak apsorbanca na ~ 265 nm (262 nm i 265 nm) i pojava novog pika tokom vremena na ~ 400 nm (400 nm i 420 nm) što ukazuje na degradaciju antibiotika. UV-VIS spektar ceftriaksona se nije promenio u prisustvu Cu^{2+} , apsorbcioni maksimum je tokom 60 minuta praćenja ostao na 240 nm i 268 nm. Takođe, spektar ceftazidima se nije promenio u prisustvu Cu^{2+} , sa apsorbcionim maksimumom na 255 nm. Apсорbcioni maksimum meropenema se inicijalno nije promenio u prisustvu Cu^{2+} ($\lambda=298$ nm), ali je tokom vremena posmatranja počeo da opada.



Slika 9. UV-VIS spektri β -laktamskih antibiotika u odsustvu ili prisustvu Cu^{2+} u ekvimolarnoj koncentraciji, 50 mM fosfatni pufer, pH 7.4. (a) Penicilin G (0.2 mM); (b) Ampicilin (0.5 mM); (c) Amoksicilin (0.5 mM); (d) Cefaleksin (0.2 mM); (e) Cefaklor (0.2 mM); (f) Ceftriakson (0.05 mM); (g) Ceftazidim (0.2 mM); (h) Meropenem (0.1 mM). Spektri dobijeni za sisteme Cu^{2+} -ceftriakson i Cu^{2+} -ceftazidim su identični sumi spektara ovih antibiotika i Cu^{2+} snimljenih odvojeno. Svi antibiotici su stabilni u rastvoru bez bakra.

4.2.2. Oksimetrija

Analizom rezultata dobijenih oksimetrijom, uočena je značajna potrošnja kiseonika jedino u sistemu sa cefaklorom (Slika 10). Početna potrošnja kiseonika u pomenutom sistemu je $\sim 35 \mu\text{M}/\text{min}$.

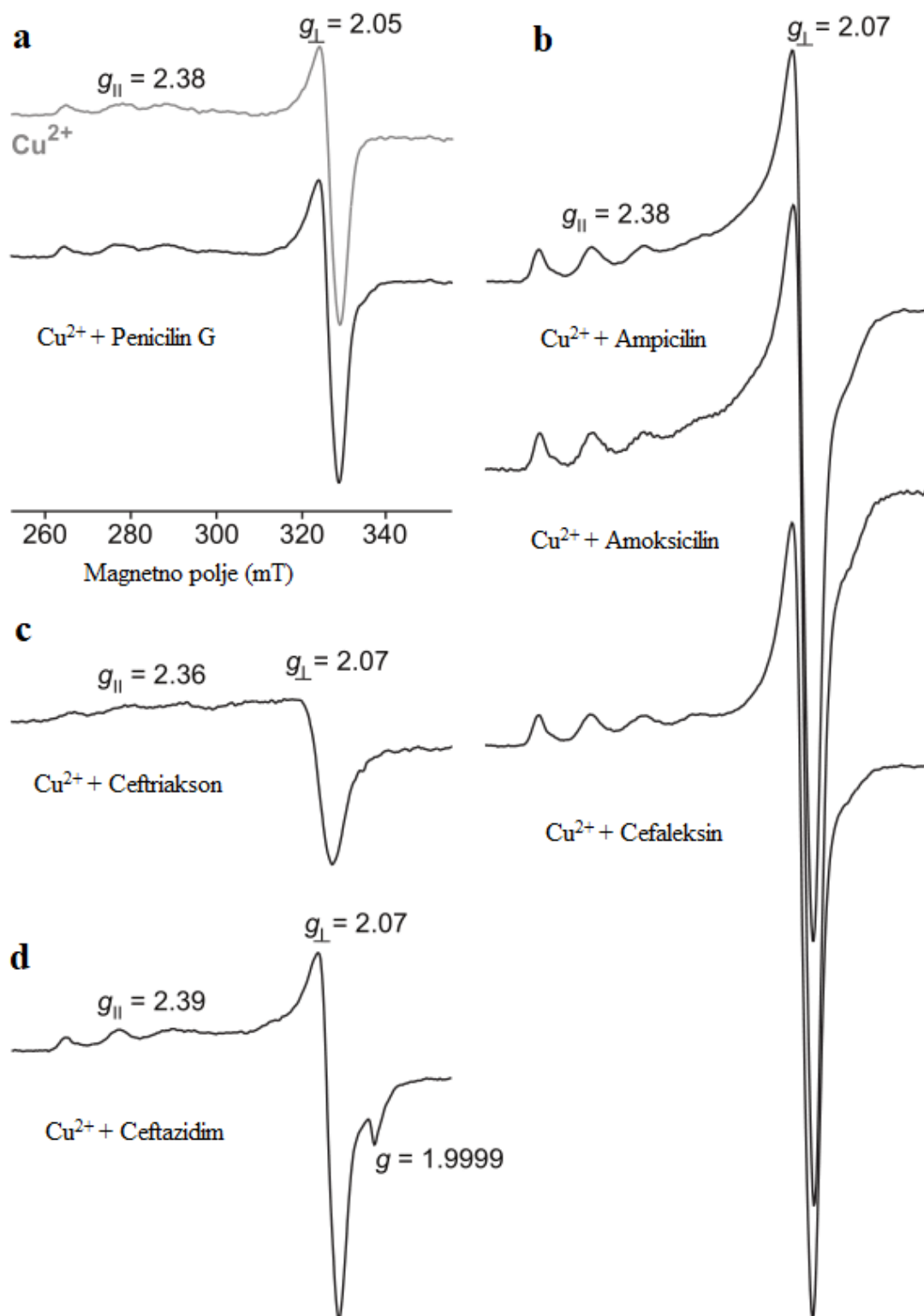


Slika 10. Promene u koncentraciji i potrošnji kiseonika u Cu^{2+} -cefaklor sistemu (0.2 mM; 0.2 mM; 1:1), fosfatni pufer, pH 7.4. Vodonik peroksid je kvantifikovan nakon 30 minuta praćenja, dodatkom katalaze u sistem.

4.2.3. EPR analiza

Na Slici 11 su prikazani EPR spektri kompleksa Cu^{2+} i β -laktamskih antibiotika koji se nisu razgradili u prisustvu Cu^{2+} . EPR spektri ispitivanih uzoraka su imali sličan izgled u ispitivanim 1:1 i 2:1 odnosima, pa je na slici prikazan samo 1:1 odnos. Karakterističan signal Cu^{2+} u fosfatnom puferu je $g_{\perp} = 2.05$ sa četiri slabe linije nastale usled hiperfinog cepanja $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ ($I=3/2$) $g_{\parallel} = 2.38$. Rezultat $g_{\parallel} > g_{\perp} > g_e$ govori o oktaedralnoj koordinaciji sa tetragonalnom distorzijom. Ovakav rezultat nije se promenio u prisustvu penicilina G. Slični rezultati, geometrija i distorzija, su opaženi i analizom kompleksa Cu^{2+} sa ampicilinom, amoksicilinom i cefaleksinom. U slučaju tri pomenuta antibiotika signal je 1.5 puta jači. Promene u rezultatima jačine g_{\perp} govore u prilog smanjenja anizotropije. Kada se analizira ponašanje Cu^{2+} u puferu uočava se njegovo prisustvo u dve forme pri pH 7.4: nerastvorljiv $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ i rastvorljiv oblik $\text{Cu}(\text{HPO}_4)_2^{2-}$ pri čemu je $\text{Cu}(\text{HPO}_4)_2^{2-}$ glavni EPR aktivni oblik Cu^{2+} . Jači intenzitet spektara koji po obliku nisu izmenjeni ukazuje da ovi antibiotici formiraju komplekse sa Cu^{2+} koji su slične geometrije kao sa fosfatnim jonima, ali i da pomenuti antibiotici povećavaju rastvorljivost bakra pri fiziološkoj pH.

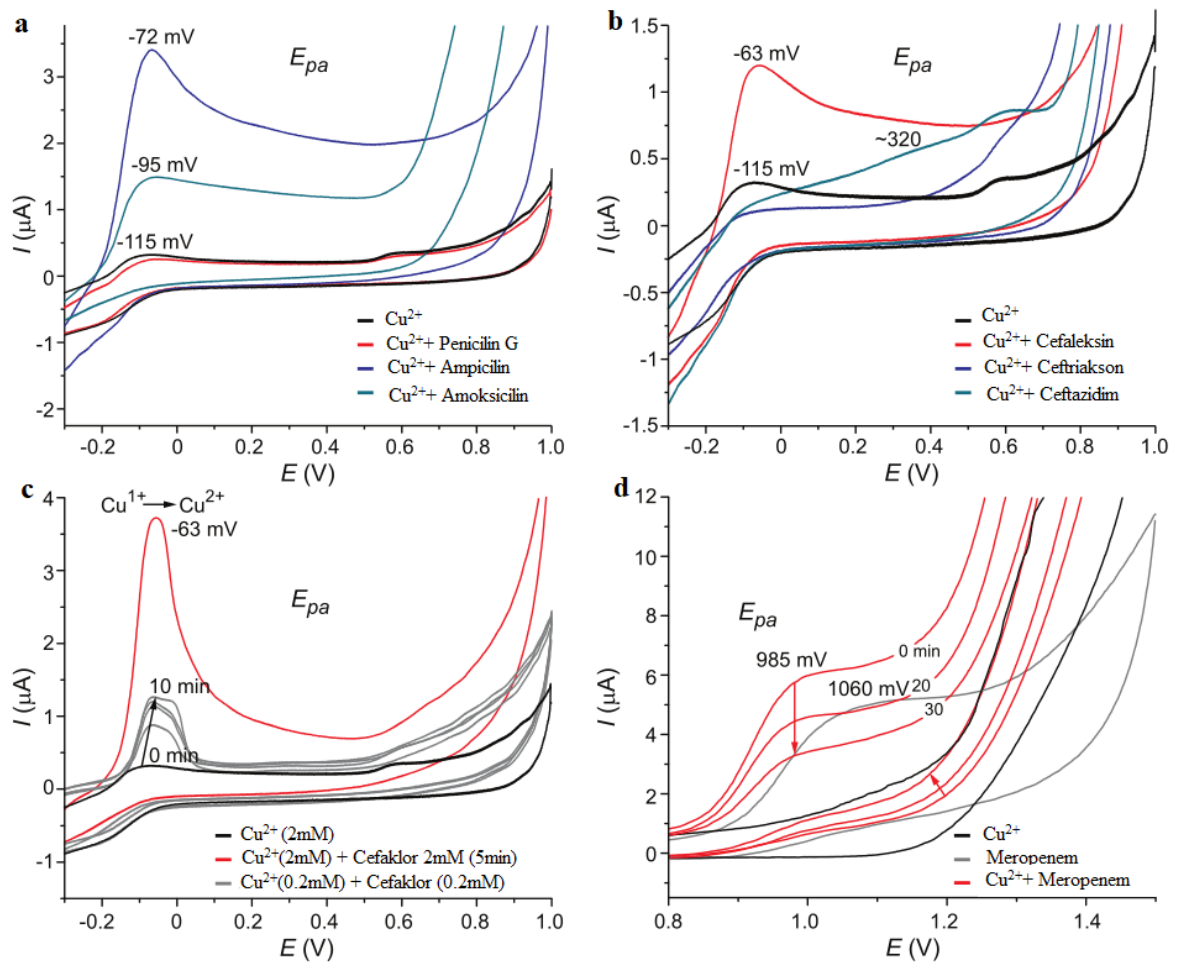
Na Slici 11 se uočava drugačiji EPR spektar Cu^{2+} u prisustvu ceftriaksona što ukazuje na formiranje koordinacionog kompleksa drugačije geometrije u odnosu na Cu^{2+} koordinisanog fosfatnim jonima. Oblik i šira g_{\perp} linija ($\Delta B = 7.8$ mT vs. $\Delta B \sim 4.9$ mT) govore u prilog drugačije geometrije u poređenju sa do sada opisanim kompleksima, što se može pripisati rigidnosti ketoksamin grupe. Analizom EPR spektra Cu^{2+} i ceftazidima uočavaju se vrednosti $g_{\parallel} = 2.39$, $g_{\perp} = 2.07$ i dodatni signal $g = 1.99$. Glavni signal pripisan Cu^{2+} je ostao sa oktaedralnom orijetacijom i tetragonalnom distorzijom. Ceftazidim može da bude ligand za stvaranje koordinacionih veza preko atoma N u ketoksamin i amidnoj grupi i preko O u karboksilatnoj grupi bočnog lanca. Novonastali signal $g = 1.99$ je značajno uži u poređenju sa drugim linijama ($\Delta B = 1.4$ mT vs. $\Delta B \sim 4.9$ mT) i potiče od organskog radikala koji nastaje u reakciji sa Cu^{2+} . Cu^{2+} može da se veže i za O atom u cefalosporinskom prstenu sa deprotonisanom karboksilnom grupom. Ovo vezivanje može rezultovati otvaranjem prstena i stvaranjem radikala.



Slika 11. EPR spektri 0.2 mM Cu^{2+} u odsustvu i prisustvu 0.2 mM β -laktamskih antibiotika, 50 mM fosfatni puffer, pH 7.4. (a) Cu^{2+} - siva boja bez antibiotika, crna boja u prisustvu penicilina G; (b) Cu^{2+} u prisustvu ampicilina, amoksicilina, cefaleksina; (c) Cu^{2+} u prisustvu ceftriaksona; (d) Cu^{2+} u prisustvu ceftazidima.

4.2.4. Ciklična voltametrija

Na Slici 12 su prikazani ciklični voltamogrami Cu^{2+} i ekvimolarnih koncentracija β -laktamskih antibiotika u 50mM fosfatnom puferu, $\text{pH} = 7.4$. CV Cu^{2+} pokazuju slabe strujne pikove zbog prisustva nerastvorenog oblika $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ pri $\text{pH} = 7.4$ (Slika 12a). U prisustvu ampicilina, amoksicilina i cefaleksina opaža se značajno povećanje strujnih pikova (Slika 12a i 12b), što je u skladu sa rezultatima dobijenim EPR-om, kao i blago povećanje oksidacionog/anodnog potencijala (E_{pa}). Ceftriakson i ceftazidim nisu značajnije uticali na i_p (Slika 12b). Nakon pet minuta inkubacionog perioda sa cefaklorom opaža se značajan porast i_p (Slika 12c). Analizom sistema Cu^{2+} -meropenem se uočava centralno pozicionirani ligand sa značajnim porastom i_p koji je tokom vremena opadao, slično kao što je opisano i analizom rezultata UV-VIS spektroskopije. Na slici 12 se opaža promena E_{pa} u slučaju samo meropenema 1060 mV do 985 mV u slučaju sistema Cu^{2+} -meropenem što ukazuje na sulfidnu grupu kao potencijalno mesto oksidacije.



Slika 12. Ciklična voltametrija Cu^{2+} i β -laktamskih antibiotika, 50 mM fosfatni pufer, pH 7.4. (a) Cu^{2+} 2 mM u odsustvu ili prisustvu 2 mM penicilina G, ampicilina, amoksicilina; (b) Cu^{2+} 2 mM u odsustvu ili prisustvu 2 mM cefaleksina, ceftriaksona i ceftazidime; (c) promene u CV Cu^{2+} (0.2 mM ili 2 mM) tokom inkubacije sa ekvimolarnim koncentracijama cefaklora; (d) CV Cu^{2+} 0.5 mM, CV meropenem 0.5 mM, CV sistema Cu^{2+} -meropenem. Strelicama su označene promene u struji.

4.2.5. MIK

Rezultati analize MIK su prikazani u Tabeli 1. Penicilin G nije aktivan protiv gram-negativnih bakterija (*E. coli*). U odnosu na aktivnost protiv *S. aureus* uočava se značajno povećanje vrednosti MIK u prisustvu jona bakra. Dejstvo ampicilina u prisustvu jona bakra na *S. aureus* je ostalo nepromenjeno (ispod nivoa detekcije), ali je vrednost MIK protiv *E. coli* veća u odnosu na MIK samog ampicilina. Sistem Cu²⁺-amoksicilin pokazuje veće vrednosti MIK protiv *E. coli* i *S. aureus* u odnosu na sam amoksicilin. Aktivnost cefaleksina u prisustvu Cu²⁺ protiv *E. coli* je poboljšana, ali je dejstvo Cu²⁺-cefaleksina nepromenjeno protiv *S. aureus* u odnosu na sam cefaleksin. U slučaju sistema Cu²⁺-cefaklor, opaža se poboljšana aktivnost protiv *E. coli*, ali nepromenjena aktivnost protiv *S. aureus*. Sistem Cu²⁺-ceftriakson pokazuje povećanje vrednosti MIK prilikom delovanja na oba soja *E. coli* i *S. aureus*. Uticaj Cu²⁺ na antibakterijsku aktivnost ceftazidima nije doveo do značajnih promena. U pogledu meropenema, uočava se značajno smanjenje antibakterijske aktivnosti (značajno povećanje MIK, >1000) u prisustvu Cu²⁺ i protiv *E. coli* i protiv *S. aureus*.

Tabela 1. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC; µg/mL) β-laktamskih antibiotika u odsustvu ili prisustvu ekvimolarne koncentracije Cu²⁺ ispitana na sojevima *E. coli* i *S. aureus*.

Antibiotik	U uslovima bez Cu ²⁺		U uslovima sa Cu ²⁺	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Penicilin G	-	<6.25	-	62.5
Ampicilin	25	<6.25	125	<6.25
Amoksicilin	62.5	<6.25	1000	62.5
Cefaleksin	125	<6.25	25	<6.25
Cefaklor	50	<6.25	25	<6.25
Ceftriakson	<6.25	<6.25	12.5	12.5
Ceftazidim	12.5	12.5	12.5	25
Meropenem	12.5	<6.25	>1000	>1000

5. DISKUSIJA

U našem radu je uočeno da molekul BR i jon Cu^{2+} ne formiraju stabilni kompleks, već da dolazi do redukcije Cu^{2+} do Cu^{1+} u odnosu 1:1. Cu^{1+} nije stabilan na fiziološkoj pH i dalje redukuje molekularni kiseonik što je praćeno stvaranjem slobodnih radikala i akumulacijom H_2O_2 i oštećenjem membrane eritrocita. Primena penicilamina kao helatora bakra dovodi do smanjenja redoks interakcija i posledično može smanjiti štetne efekte BR u slučajevima poput neonatalne žutice. Drugi deo našeg istraživanja koji se bazirao na koordinativnim interakcijama β -laktamskih antibiotika i Cu^{2+} je pokazao 1:1 stehiometrijski odnos u slučaju ampicilina, amoksisicilina, cefaleksina, ceftriaksona i ceftazidima. Sa druge strane molekul penicilina G ne stupa u interakcije sa Cu^{2+} , indirektno upućujući na primarnu amino grupu bočnog lanca kao mesto koordinativnih interakcija bakra i ampicilina, amoksisicilina i cefaleksina. Interakcijom između cefaklora i Cu^{2+} dolazi do stvaranja slobodnih radikala, a krajnji rezultat interakcija meropenema i Cu^{2+} je razgradnja antibiotika. Zbog pomenutih interakcija dolazi do promena u antibakterijskoj aktivnosti pomenutih antibiotika što upućuje na oprez prilikom njihove upotrebe u stanjima povišene koncentracije jona bakra.

U pogledu analize *in vitro* interakcija Cu^{2+} i BR korišćenjem spektroskopije dobijeni su rezultati koji se mogu uporediti sa literaturnim podacima. Naime, u literaturi je već opisano da prisustvo molekula sa oksidativnim svojstvom, poput Cu^{2+} dovodi do ireverzibilne razgradnje molekula BR (McDonagh, 2010). I u našim rezultatima opaža se smanjenje apsorbance prilikom ispitivanja sistema BR: Cu^{2+} tokom vremena. Kada posmatramo promene u apsorbanci očitavamo pored karakteristične vrednosti za biliverdin i druge vrednosti što implicira na postojanje brojnih drugih razgradnih produkata nastalih od BR. Slične promene u spektru i nastanak brojnih degradacionih kompleksa su takođe opisani u literaturi (McDonagh, 2010). U našim rezultatima takođe je registrovana mala koncentracija biliverdina $\sim 20\mu\text{M}$.

Drugim delom ispitivanja na spektrofotometru pokazano je stabilno ponašanje BR u fosfatnom puferu. Naime pri fiziološkom pH, dominantni oblik BR je dikiselina koja nije naelektrisana pa se malo smanjenje maksimalne apsorbance može pripisati pojavi precipitacije. Upravo ovaj elektroneutralni, dikiselinski oblik BR lako difunduje kroz membrane i veruje se da je odgovoran za neurotoksične efekte u neonatalnoj žutici

(Ostrow i sar., 2003; Ostrow i Mukerjee, 2007). Analizom sistema Fe^{3+} i BR je uočeno nepostojanje koordinativnih i redoks interakcija. U pogledu ovog dela rezultata važno je poznavati Pearsonov HSAB princip. HSAB princip indirektno objašnjava razliku u afinitetu BR prema Cu^{2+} i Fe^{3+} . Prema ovom principu granične kiseline poput pojedinih katjona metala kao što je Cu^{2+} pokazuju tendenciju ka graničnim bazama kao ligandima, a teške baze poput Fe^{3+} ka teškim kiselinama (Hass i Franz, 2009). Afinitet pirola, kao granične baze je prema tome veći ka Cu^{2+} nego prema Fe^{3+} tako da je verovatno da BR i Cu^{2+} grade prelazni kompleks koji je praćen transferom elektrona.

U cilju daljeg opisa elektrohemijski aktivnog sistema BR: Cu^{2+} primenili smo cikličnu i pulsnu voltametriju. Analizom krive uočeni su očekivani strujni pikovi za Cu^{2+} i Cu^{1+} (Haynes, 2014). Promene u intenzitetu strujnih pikova su opažene u sistemu sa BR što verovatno ukazuje na određen stepen adhezije i/ili smetnje usled interferirajućih osobina BR. U našem eksperimentu se opaža vremenski zavisno opadanje strujnog pika Cu^{1+} i istovremeni porast strujnog pika Cu^{2+} . Analizom pikova, možemo zaključiti da BR dovodi do redukcije Cu^{2+} i stvaranja Cu^{1+} koji potom podleže spontanoj oksidaciji i ponovnim stvaranjem Cu^{2+} . Sledeće pitanje koje se postavilo se ticalo odnosa BR i Cu^{2+} . Imajući u vidu da je koncentracija redukovanog Cu^{2+} slična koncentraciji BR potrebnog za redukciju proizilazi da je odnos u ovom sistemu 1:1. U prilog ovakvom stehiometrijskom odnosu govore i prethodna istraživanja (Adhikari i sar., 1998; Asad i sar., 2001).

EPR predstavlja metodu izbora za ispitivanje Cu^{2+} kompleksa i daje najpreciznije informacije o kompleksima, kvantifikuje spin, opisuje strukturne i funkcionalne karakteristike (Hagen, 2006; Rosenzweig, 2009). Tipičan EPR spektar dvovalentnog jona bakra obuhvata g_{\perp} u aksijalnoj simetriji i četiri EPR linije duž g_{\parallel} koje potiču od hiperfinog cepanja izotopa $^{63}/^{65}$ jona bakra sa spinom $3/2$ (Hagen, 2006). S obzirom na brzinu kojom je BR indukovao redukciju Cu^{2+} opaženu prethodno na cikličnoj voltametriji, EPR spektar je sniman nakon inkubacije od 30 s. Promene u jačini EPR signala se jasno učitavaju nakon dodatka BR sistemu. Ovakve promene jasno potvrđuju pojavu BR indukovane redukcije Cu^{2+} . Pored rezultata dobijenih UV-VIS spektroskopijom, i EPR spektar takođe upućuje na nepostojanje BR: Cu^{2+} kompleksa pri pH 7.4. Interesantni rezultat dobijen EPR metodom je da iako je odnos BR: Cu^{2+} 1:1, u sistemu i dalje ostaje detektovan Cu^{2+} upućujući na zaključak da nije

sav Cu^{2+} podložan redukciji. Ovakvo opažanje je suprotno od naših rezultata dobijenih pomoću voltametrije. Navedene nalaze ipak možemo objasniti drugačijim ponašanjem Cu^{2+} u fosfatnom puferu pH 7.4 (EPR eksperiment) i u vodi pH 5 (voltametrij). Kao što je prikazano na Slici 6, uočavamo da je deo Cu^{2+} pri pH 7.4 u obliku nerastvorljivih fosfata i kao takav ne podleže BR indukovanoj redukciji. Signal preostalog Cu^{2+} u prisustvu BR pokazuje specifičan EPR izgled, u pogledu šire g_{\perp} linije i gubitka hiperfinog cepanja. S obzirom da se zna da na g vrednost pored elektronskog okruženja utiče i anizotropija opažene promene u EPR spektru se možda mogu objasniti anizotropijskim interakcijama (Weil i Bolton, 2007). Drugo moguće objašnjenje je još uvek nedovoljno objašnjena hiperfina struktura Cu^{2+} u čvrstom stanju (Weil i Bolton, 2007).

Kao što je već naglašeno u uvodu rada već dugi niz godina poznata je uloga D-penicilamina kao leka koji doprinosi urinarnoj ekskreciji jona bakra kod pacijenata sa Wilsonovom bolešću. Upravo zbog ove indikacije započete su brojne studije u cilju detaljnijeg opisa interakcija između jona bakra i D-penicilamina. Dobra efikasnost PA je objašnjena njegovom dualnom ulogom: sposobnošću da bude helator i reduktor jona bakra (Birker i Freeman, 1977). Kao način praćenja delovanja PA u našoj studiji, analizirali smo EPR spektar Cu^{2+} u njegovom prisustvu, a potom i u prisustvu BR. Prva zabeležena promena je širi signal heliranog Cu^{2+} u odnosu na samostalni Cu^{2+} . Širenje signala Cu^{2+} heliranog PA verovatno nastaje kao rezultat dipolarnih interakcija između paramagnetnih centara šest atoma Cu^{2+} u PA- Cu^{2+} klasteru (Birker i Freeman, 1977). Druga komponenta EPR signala se odnosi na već opisani signal Cu^{2+} u fosfatnom puferu. Inkubacijom sa BR uočava se smanjenje signala slobodnog Cu^{2+} , dok je u slučaju Cu^{2+} -PA uticaj minimalan što govori u prilog činjenici da je Cu^{2+} u klasteru nedostupan za BR. S obzirom da je poznato da kompleksi koji se stvaraju između redoks aktivnih metala i lipida mogu dovesti do lipidne oksidacije (Poyton i sar., 2016) u sledećem koraku pratili smo ponašanje Cu^{2+} , BR i DMPC lipozoma. Zbog opažene sličnosti u spektru Cu^{2+} vezanog za liposome i sa druge strane Cu^{2+} u fosfatnom puferu može se pretpostaviti da vezivanje dešava preko fosfatne grupe. Iz dobijenih rezultata kada je sistemu dodat i BR može se zaključiti da je Cu^{2+} vezan za fosfolipide nedostupan BR. Minimalne opažene promene u EPR signalu se mogu pripisati protonizaciji BR i stvaranju većih BR-fosfolipidnih molekula (Eriksen i sar., 1981).

Stvaranje ovakvih agregata može uticati na organizaciju lipozoma i na promenjene interakcije sa Cu^{2+} . Prema rezultatima studija na životinjama i tkivnim kulturama ovakva agregacija molekula BR je odgovorna za njegove toksične efekte (Eriksen i sar., 1981).

Jedan od bitnijih činioca u tumačenju uloge jona bakra u organizmu je njegova katalitička sposobnost stvaranja slobodnih radikala (Reybier i sar., 2016). Pri fiziološkim uslovima oksidacijom Cu^{1+} nastaje Cu^{2+} uz istovremeno stvaranje superoksidnog anjona koji se potom redukuje do vodonik peroksida (Reybier i sar., 2016). Primenom oksimetrije naši rezultati pokazuju da sistem BR i Cu^{2+} dovodi do značajne potrošnje kiseonika i još jednom potvrđuju stehiometrijski odnos 1:1 pomenutog sistema. Pokazano je da prisustvo PA u sistemu značajno smanjuje potrošnju kiseonika što govori u prilog njegove uloge helatora prooksidativnih metala čime posledično doprinosi smanjenju produkcije slobodnih radikala (Qureshi i Kumar, 2013). Iako je pokazano da se dodatkom katalaze veliki deo kiseonika ponovo javlja u sistemu, određena koncentracija vodonik peroksida se gubi. Navedeno opažanje se može objasniti reakcijom sličnoj Fentonovoj, po kojoj Cu^{1+} reaguje sa vodonik peroksidom i generiše nastanak Cu^{2+} , hidroksilnog anjona i hidroksilnog radikala (Spasojević i sar., 2010). Upravo je oksidacija redoks aktivih metala pomoću vodonik peroksida važan prooksidativni proces koji posledično može dovesti do brojnih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Cui i sar., 2004; Spasojević i sar., 2010).

Kao što je do sada već objašnjeno, posledice redoks interakcija u sistemu Cu^{2+} i BR su stvaranje slobodnih radikala koji imaju različita ciljna mesta delovanja. Opisano je da je vodonik peroksid lako prolazi ćelijsku membranu, uzrokuje intracelularni oksidativni stres i ćelijsku smrt. Sa druge strane hidroksilni radikal, nastao u reakciji sličnoj Fentonovoj je značajno reaktivniji i manje stabilan od vodonik peroksida i iz tog razloga obično ograničen na ekstracelularno delovanje (Spasojević, 2011; Mojić i sar., 2014). Zbog pomenutog razloga, ne iznenađuje da su naši rezultati u skladu sa literaturnim podacima po kojima je pokazano da Cu^{2+} i BR dovode do lipidne peroksidacije i oštećenja eritrocitne membrane (Brites i sar., 1997; Horsley i sar., 2007). Pored toga što ovu pojavu možemo objasniti već opisanim redoks interakcijama Cu^{2+} i ćelijske membrane, ulogu ima i mehanički uticaj BR na membrane (Brito i sar., 2001; Horsley i sar., 2007). Uticaj nekonjugovanog BR se uobičajno opisuje pomoću dva

puta; agresivniji koji dovodi do ćelijske smrti i umereniji put koji dovodi do reverzibilnog oštećenja (Brito i sar., 2001). Toksični efekti nekonjugovanog BR se ogledaju u uticaju na morfologiju, simetriju i promene u lipidnom sastavu ćelijske membrane eritrocita (Brito i sar., 2000; Brito i sar., 2001). Sa kliničke strane, takođe je važno napomenuti da su studije pokazale potenciranje pomenutih efekata BR pri acidozi koja je česti pratilac neonatalne hiperbilirubinemije (Brito i sar., 2001). Naši rezultati upućuju na značajniji stepen lipidne peroksidacije i hemolize eritrocita prilikom istovremenog izlaganja Cu^{2+} i BR. S obzirom da smo već opisali da vezivanje Cu^{2+} za liposome sprečava BR indukovanu redukciju, nameće se zaključak da se isti mehanizam ne odigrava na eritrocitnoj membrani. Očekivani rezultati su dobijeni u pogledu smanjenja oštećenja u sistemima kojima je dodat PA, ali su markeri oštećenja ostali povišeni u odnosu na kontrolne uzorke. Kada se PA posmatra kao helator Cu^{2+} , onda je i logičan rezultat smanjenje prooksidativne aktivnosti Cu^{2+} ali ne i uticaj na direktne efekte BR na ćelijsku membranu. Imajući u vidu da je kod neonatusa koji su u riziku od nastanka kernikterusa koncentracija nekonjugovanog BR svega ~20 nM (Hulzebos i Dijk, 2014), značajnije posledice mogu se očekivati od sinergističkog efekta Cu^{2+} i BR u odnosu na sam direktan uticaj BR.

S obzirom da promene koje nastaju interakcijom β -laktamskih antibiotika i Cu^{2+} upućuju na nastanak prilično složenih interakcija drugi deo našeg istraživanja se odnosio na objašnjenje interakcija Cu^{2+} sa β -laktamskim antibioticima. Naime, tumačenjem naših rezultata dobijenih UV-VIS spektrofotometrijom uočava se izostanak promena spektra penicilina G u prisustvu Cu^{2+} . Suprotno tome, UV-VIS spektar ampicilina, amoksicilina i cefaleksina ukazuje na formiranje stabilnih obojenih kompleksa. Ovaj rezultat je od velike važnosti kada se zna da je razlika između penicilina G i pomenuta tri antibiotika u NH_2 grupi bočnog lanca što upućuje na zaključak da je upravo ova grupa i mesto koordinativnih interakcija sa jonima bakra. Detaljnijom analizom spektra ampicilina i amoksicilina sa Cu^{2+} se uočavaju slični pikovi, λ 310 nm i λ 645 nm. Prema literaturnim podacima λ između 600 i 800 se može pripisati d-d tranziciji Cu^{2+} (Mesu i sar., 2006). U slučaju amoksicilina uočava se i karakteristična λ 273 nm čiji nastanak je u vezi $\pi \rightarrow \pi$ tranzicijom u fenolnom prstenu na koju joni bakra nemaju uticaja (Pretsch i sar., 2009). Daljom analizom uočena je $\lambda \sim 310$ nm za cefaleksin i $\lambda \sim 320$ nm za cefaklor koja se može objasniti koordinativnim vezama

liganda i metala koje rezultuju elektronskim transferom (Faggi i sar., 2015). Kao drugo potencijalno mesto vezivanja možemo označiti N u amidnoj grupi. Analizom literature možemo naići na zaključke da se vezivanje cefaleksina i jona bakra odvija preko amino, karboksilne i amid karbonilne grupe ali u uslovima kada je kao rastvarač korišćen metanol (Anacona i Rodriguez, 2004). Tokom perioda praćenja spektra cefaleksina i cefaklora Cu^{2+} , jasno se uočava nestanak λ_{max} 265 nm i pojava novog pika na ~400 nm što ukazuje na degradaciju pomenutih antibiotika u prisustvu Cu^{2+} . Degradacija cefaklora se odigrala značajno brže u odnosu na cefaleksin. Prethodna studija je pokazala da λ_{max} 265 nm cefaklora uzrokovana O=C-N-C=C- grupom cefaloporinskog prstena (Ivama i sar., 1999). S druge strane, UV-VIS spektar ceftriaksona i ceftazidima se nije promenio u prisustvu Cu^{2+} . Verovatno je da Cu^{2+} ne intereaguje sa najjačim hromoforama (funkcionalne grupe koje apsorbuju UV-VIS zračenja) ovih antibiotika. Takođe tranzicija elektrona između Cu^{2+} i ceftriaksona i ceftazidima ima niže ekstincione koeficijente u odnosu na hromofore. Spektroskopske analize su pokazale da je ekstincioni koeficijent za ceftriakson pri apsorbcionom maksimumu 240 i 268 nm ~ $30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a za ceftazidim pri apsorbcionom maksimumu 260 nm ~ $8600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cantu i sar., 1996; Ali, 2011). Apsorbancu ceftriaksona verovatno određuju cefalosporinski prsten i triazin dion prsten. Absorbicioni maksimum aminotiazolnog prstena je 253 nm ali je ekstincioni koeficijent $8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ značajno niži u poređenju sa vrednostima samog ceftriaksona (Hirayama, 1967). Apsorbicioni maksimum ceftazidima verovatno određuju aminotiazolni i piridiniumski prsten. Prema našim rezultatima ceftazidim i Cu^{2+} ne intereaguju na nivou aminotiazolnog prstena. S druge strane, rezultati dobijeni spektroskopijom su nedovoljno jasni da bismo izveli zaključak o mogućim interakcijama ceftriaksona i Cu^{2+} na nivou aminotiazolnog prstena. Iako literaturni podaci opisuju stvaranje koordinativnih veza između ketoksamin grupe ($\lambda \sim 190 \text{ nm}$) ova dva antibiotika i Cu^{2+} (Hirayama, 1967; Jayaraju i Kondapi, 2001), u našem istraživanju to nije zabeleženo. Analizom dobijenog spektra meropenema (λ_{max} 298 nm) uočava se vremenski zavisno opadanje signala u prisustvu jona bakra što upućuje na zaključak da se odigrava degradacija meropenema.

Korišćenjem oksimetrije u cilju opisa redoks interakcija Cu^{2+} i β -laktamskih antibiotika dobijeni su interesantni rezultati. Naime, samo u sistemu sa cefaklorom je opažena značajna potrošnja kiseonika i akumulacija vodonik peroksida. Step

potrošnje kiseonika u ovom sistemu može reflektovati kinetiku razgradnje cefaklora: cefaklor + Cu²⁺ + O₂ → cefaklor· + Cu²⁺ + O₂^{·-} (Cu¹⁺ je intermedijer). Sa druge strane, zanimljivo je da iako se meropenem razgrađuje u prisustvu Cu²⁺, ne beleži se potrošnja kiseonika što implicira da meropenem ne podleže oksidaciji ili da ima ulogu stabilizatora Cu¹⁺.

Analizom rezultata EPR spektroskopije potvrđen je 1:1 molarni odnos Cu²⁺ i β-laktamskih antibiotika prethodno opisan i pomoću UV-VIS spektroskopije. Dobijeni spektar bakra u fosfatnom puferu ($g_{||} > g_{\perp} > g_e$ (g -vrednost za slobodni elektron=2.0023)) je već opisan u literaturi i govori u prilog oktaedraelne koordinacije sa tetragonalnom distorzijom (Rosenzweig, 2009; Bund i sar., 2010). Takođe, tumačeći promene u EPR signalu možemo doći do zaključka o koordinativnim promenama na nivou paramagnetnih centara Cu²⁺ (Zhao i sar., 2016). Prema našim rezultatima Cu²⁺ u fosfatnom puferu pri fiziološkom pH je prisutan u dva oblika, nerastvorljivi Cu₃(PO₄)₂ i rastvorljivi Cu(HPO₄)₂²⁻. Opaženi široki EPR signal tri-nuklearnog molekula, Cu₃(PO₄)₂, se može pripisati intra molekularnim spin-spin interakcijama između Cu²⁺ centara (Zhao i sar., 2016). Iz pomenutog proizilazi da je Cu(HPO₄)₂²⁻ glavni EPR aktivni oblik Cu²⁺. U pogledu analize interakcija Cu²⁺ i β-laktamskih antibiotika, uočavamo da penicilina G nije uticao na signal Cu²⁺ čime je još jednom potvrđen rezultat dobijen UV-VIS spektroskopijom o nepostojanju kompleksa pri fiziološkim uslovima. Dobijeni EPR spektri ampicilina, amoksicilina i cefaleksina u kompleksu sa jonima bakra upućuju na očuvanu oktaedraelnu geometriju sa tetragonalnom distrozijom i na blago smanjenje anizotropije. Dobijeni jači intenzitet signala možemo objasniti povećanom rastvorljivošću jona bakra u prisustvu tri pomenuta antibiotika. Izgleda da ampicilin, amoksicilin i cefaleksin prevode nerastvorljivi oblik bakra u rastvorljivi mono nuklearni kompleks sa dve koordinativne veze za antibiotike i dva preostala vezna mesta za fosfatne jone. Na ovaj način pomenuti antibiotici mogu dovesti do povećanja koncentracije reaktivnog bakra u telesnim tečnostima. Suprotno ovome, EPR spektar Cu²⁺ je značajno promenjen u prisustvu ceftriaksona što se može tumačiti formiranjem koordinativnog kompleksa ali ovaj put drugačije geometrije u odnosu na opisanu geometriju Cu²⁺ u fosfatnom puferu. Kao vezno mesto predložen je atom azota u amidnoj i ketoksamin grupi (Santini i sar., 2014). Rezultati nedavno objavljenog istraživanja su pokazali da primena ceftriaksona može dovesti do inhibicije rasta

karcinoma pluća u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Li i sar., 2012). Takođe u literaturi nalazimo podatak da kompleksi Cu^{2+} koji uključuju donore azota poseduju određeni stepen antitumorske aktivnosti (Santini i sar., 2014). Iz pomenutog sledi da upravo interakcije ceftriaksona sa jonima bakra mogu doprineti njegovom antitumorskom potencijalu. Analizom ponašanja ceftazidima i Cu^{2+} uočavamo očuvanje karakteristične orijentacije i distorzije. Pretpostavka je da ceftazidim deluje kao ligand sa tri vezna mesta: N atom u ketoksamin grupi i amidnoj grupi, i atom kiseonika u karboksilnoj grupi bočnog lanca. Vezivanje Cu^{2+} za ceftazidim je moguće i preko atoma kiseonika u deprotonisanoj karboksilnoj grupi dihidrotiazinskog prstena što je praćeno otvaranjem prstena i stvaranjem slobodnih radikala. Upravo se ova promena beleži i na EPR u vidu novog uskog g signala.

Kao što je već pokazano u delu ispitivanja interakcija Cu^{2+} i BR, fosfatni pufer dovodi do slabljenja struja bakra pri elektrohemijском ispitivanju, a sam bakar je pri fiziološkim uslovima pH 7.4 prisutan u nerastvorljivom obliku $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$. Nasuprot slabim strujnim pikovima samog bakra opaženih na CV, su pikovi nastali u kompleksu sa ampicilinom, amoksicilinom i cefaleksinom. Ovaj rezultat još jednom potvrđuje da pomenuta tri antibiotika dovode do povećanja rastvorljivosti bakra u fosfatnom puferu pri fiziološkim uslovima. Ukoliko se znaju sve uloge koje reaktivni bakar ima u organizmu, podatak o porastu njegove koncentracije može biti od kliničkog značaja. Rezultati dobijeni CV su još jednom ukazali na sposobnosti cefaklora da redukuje bakar. Ključna strukturna razlika između cefaklora i cefaleksina, kod koga ovakve promene nisu zabeležene je u prisustvu jona hlora. Zaključak navedenog dela elektrohemijского ispitivanja je da u prisustvu Cu^{2+} elektronegativni atom Cl povlači elektrone iz cefalosporinskog prstena čime dovodi do destabilizacije prstena i redukcije bakra do Cu^{1+} . Analizom CV meropenema uočavamo vrednosti potencijala koje su u literaturi već opisane i pripisane ireverzibilnoj oksidaciji sulfidne grupe (Stankovic i sar., 2016). U prisustvu jona bakra, potencijal se u sistemu menja označavajući sulfidnu grupu kao ključno mesto oksidacije. Slično kao što smo prikazali u rezultatima UV-VIS sistema Cu^{2+} -meropenema, i CV prikazuje istu kinetiku razgradnje meropenema. Prema pomenutom HSAB principu blage baze poput sulfida pokazuju veću težnju ka blagim kiselinama poput Cu^{1+} , nego ka intermedijarnim kiselinama poput Cu^{2+} (Haas i sar., 2009).

Sa stanovišta kliničke prakse izuzetno važan deo rezultata se tiče MIC analiziranih antibiotika u prisustvu jona bakra. Penicilin G je u prisustvu jona bakra pokazao smanjenu aktivnost protiv *S. aureus*. S obzirom da u našim rezultatima nisu zabeležene interakcije između penicilina G i jona bakra, promene u antibakterijskoj aktivnosti možemo pripisati pojavi bakrom indukovane degradacije penicilina G (Cressman i sar., 1966). Naime, prema jednoj od prvih studija koja se bavila pomenutim interakcijama, u prisustvu jona bakra pri uslovima pH = 5.5 i temperaturi 30°C dolazilo je do brze hidrolize penicilina G (Cressman i sar., 1966). S obzirom da se MIC određuje nakon 24 časovne inkubacije pri temperaturi od 37°C može se očekivati određeni stepen razgradnje penicilina G što posledično dovodi do smanjenja antibakterijske aktivnosti. Suprotno studiji opisanoj u uvodu, po kojoj je aktivnost ampicilina i amoksicilina poboljšana u prisustvu jona bakra protiv *E. Coli* (Gamel, 2010) su naši rezultati. Naše opažanje o značajno nižoj antimikrobnoj sposobnosti ampicilina i amoksicilina nakon formiranja kompleksa sa metalnim jonom upućuje na oprez prilikom upotrebe ovih antibiotika u stanjima sa povišenom koncentracijom jona bakra. U pogledu kompleksa Cu²⁺-cefaleksin uočava se poboljšanje aktivnosti u odnosu na sam cefaleksin protiv *E. coli* što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Chohan i sar., 2004; Auda i sar., 2008; Ali, 2011). U našem eksperimentalnom radu je uočeno poboljšanje aktivnosti cefaklora u kompleksu sa jonima bakra protiv *E. coli*. Ovu pojavu možemo povezati sa osobinom cefaklora da redukuje Cu²⁺ što je praćeno stvaranjem vodonik peroksida koji može doprineti antimikrobnom delovanju leka. Aktivnost ceftriaksona je umanjena u prisustvu Cu²⁺ i protiv *E. coli* i *S. aureus*, što je u skladu sa literaturnim podacima (Ali, 2011). U slučaju ceftazidima, antimikrobna aktivnost je smanjena protiv *S. aureus*. U literaturi se promena u antimikrobnoj aktivnosti kompleksa cefalosporina i Cu²⁺ objašnjava smanjenom intestinalnom resorpcijom antibiotika (Auda i sar., 2009). U skladu sa našim rezultatima o degradaciji meropenema u prisustvu jona Cu²⁺ je i dobijena smanjena antibakterijska aktivnost sistema Cu²⁺-meropenem. Iako su literaturni podaci o aktivnosti Cu²⁺-meropenem oskudni, nedavno objavljena studija je pokazala da joni bakra mogu indirektno poboljšati aktivnost karbapemena inaktivirajući B metalo-β-laktamaze odgovorne za hidrolizu i posledično antimikrobnu rezistenciju (Djoko i sar., 2018). Pretpostavka pomenute studije je da bi primena nosača bakra poput

piritiona mogla dovesti do poboljšanja efekata antibiotika na karbapenem rezistentne sojeve *Enterobacteriaceae* (Djoko i sar., 2018).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu analize *in vitro* interakcija jona bakra sa bilirubinom i beta laktamskim antibioticima pomoću spektrofotometrije, elektrohemijskih metoda, elektron paramagnetne rezonancije, biohemijskih analiza hemoglobina i lipidne peroksidacije i analizom minimalne inhibitorne koncentracije možemo izvesti sledeće zaključke:

- Bilirubin redukuje Cu^{2+} do Cu^{1+} u odnosu 1:1. Cu^{1+} se odmah potom oksiduje pomoću kiseonika i generiše nastanak vodonik peroksida i hidroksil radikala koji mogu biti odgovorni za toksične efekte hiperbilirubinemije.
- Primena penicilamina kao helatora bakra, smanjuje štetne efekte izazvane interakcijom bakra i bilirubina na nivou membrana eritrocita. Penicilamin nema uticaja na direktne efekte bilirubina na membrane eritrocita.
- Objašnjeni mehanizmi toksičnosti hiperbilirubinemije upućuju na značaj budućih istraživanja o primeni helatora bakra u slučajevima neonatalne hiperbilirubinemije.
- Cu^{2+} vezan za liposome nije podložan redukciji izazvanoj bilirubinom, a sam proces vezivanja se odvija preko fosfatne grupe. Sa druge strane ovaj mehanizam se ne odvija na nivou eritrocitne membrane.
- Koordinativne interakcije ampicilina, amoksicilina, cefaleksina, ceftriaksona i ceftazidima sa jonima bakra pokazuju 1:1 stehiometrijski odnos.
- Za razliku od ampicilina, amoksicilina i cefaleksina, penicilin G ne stupa u interakcije sa jonima bakra što upućuje na zaključak da se koordinativne veze bakra i tri pomenuta antibiotika stvaraju preko primarne amino grupe bočnog lanca. Kompleks ampicilina, amoksicilina i cefaleksina sa bakrom je oktaedraelne geometrije sa tetragonalnom distorzijom i ovi antibiotici povećavaju koncentraciju rastvorljivog bakra u telesnim tečnostima. Cefaklor redukuje Cu^{2+} do Cu^{1+} koji potom reaguje sa kiseonikom pri čemu se stvara vodonik peroksid koji je verovatno odgovoran za poboljšanje antimikrobnog delovanja leka. Kompleks ceftazidima i Cu^{2+} je takođe oktaedraelne geometrije sa tetragonalnom distorzijom, a samo vezivanje se verovatno odigrava preko atoma kiseonika u deprotonisanoj karboksilnoj grupi dihidrotiazinskog prstena

što dovodi do stvaranja slobodnih radikala. Kompleks Cu^{2+} -ceftriakson je specifične geometrije, dok se meropenem razgrađuje u prisustvu jona bakra.

- S obzirom na smanjenje antimikrobne aktivnosti ampicilina, amoksicilina, ceftriaksona i meropenema u prisustvu jona bakra, neophodan je oprez prilikom njihove primene u uslovima koje karakteriše povišenje koncentracije bakra.

LITERATURA:

Abraham EP, Newton GGF. The structure of cephalosporin C. *Biochem J* 1961;79:377–93.

Abu-el-wafa SM, El-ries MA, Abou-attia FM, Issa RM. Coordination chemical studies of some polymeric transition metal complexes with neomycin and their biological activity uses. Indirect determination of neomycin by atomic absorption spectroscopy (AAS). *Anal Lett* 1989;22(13):2703-2716.

Adhikari S, Joshi R, Gopinathan C. Bilirubin as an anti precipitant against copper mediated denaturation of bovine serum albumin: formation of copper-bilirubin complex. *Biochim Biophys Acta* 1998;1380(1):109-14.

Akyilmaz E, Yorganci E, Asav E. Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution. *Bioelectrochemistry* 2010;78(2):155-60.

Ali AE. Synthesis, spectral, thermal and antimicrobial studies of some new tri metallic biologically active ceftriaxone complexes. *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2011;78(1):224–230.

Anacona JR, Acosta F. Synthesis and antibacterial activity of cephadrine metal complexes. *J Coord Chem* 2005;59: 621–627.

Anacona JR, Rodrigues I. Synthesis and antibacterial activity of cephalixin metal complexes. *J Coord Chem* 2004;57(15):1263–1269

Angelé-Martínez C, Khanh Van TN, Ameer FS, Anker JN, Brumaghim JL. Reactive Oxygen Species Generation by Copper(II) Oxide Nanoparticles Determined by DNA Damage Assays and EPR Spectroscopy. *Nanotoxicology* 2017;11(2): 278–288.

Armstrong FA, Heering HA, Hirst J. Reactions of complex metalloproteins studied by protein-film voltammetry. *Chem Soc Rev* 1997;26:169–179.

Arora V, Kulkarni RK, Cherian S, Pillai R, Shivali M. Hyperbilirubinemia in normal healthy donors. *Asia J Transfus Sci* 2009;3(2):70-72.

Asad SF, Singh S, Ahmad A, Hadi SM. Bilirubin-Cu(II) complex degrades DNA. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428(2-3):201-8.

Asad SF, Singh S, Ahmad A, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study. *Chem Biol Interact* 2001; 137(1):59-74.

Asad SF, Singh S, Ahmad A, Hadi SM. Bilirubin/biliverdin-Cu(II) induced DNA breakage; reaction mechanism and biological significance. *Toxicol Lett* 2002;131(3):181-9.

Auda SH, Knutter I, Bretschneider B, Brandsch M, Mrestani Y, Große C, Neubert RHH. Effect of Different Metal Ions on the Biological Properties of Cefadroxil. *Pharmaceuticals* 2009;2:184-193.

Auda SH, Mrestani Y, Fetouh MI, Neubert RH. Characterization and activity of cephalosporin metal complexes. *Pharmazie* 2008;63(8):555-61.

Bajčetić M, Otašević B, Prekajski NB, Spasić S, Spasojević I. Antioxidative system in the erythrocytes of preterm neonates with sepsis: the effects of vitamin E supplementation. *Ann Clin Biochem* 2014;51(Pt 5):550-6.

Birker PJ, Freeman HC. Structure, properties, and function of a copper(I)-copper (II) complex of D-penicillamine: pentathallium(I) μ 8-chloro-dodeca (D-penicillaminato)- octacuprate(I)hexacuprate(II) n-hydrate. *J Am Chem Soc* 1977;99:6890–6998.

Boiadjiev SE, Person RV, Puzicha G, Knobler C, Maverick E, Trueblood KN, Lightner DA. Absolute configuration of bilirubin conformational enantiomers. *J Am Chem Soc* 1992;114(26):10123–10133.

Bonda DJ, Liu G, Men P, Perry G, Smith MA, Zhu X. Nanoparticle Delivery of Transition-Metal Chelators to the Brain: Oxidative Stress will Never See it Coming! *CNS Neurol Disord Drug Targets*. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012; 11(1): 81–85.

Bopp SK, Abicht HK, Knauer K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat Toxicol* 2008;86(2):197-204.

Borkow G. Using copper to improve the well-being of the skin. *Curr Chem Biol* 2014;8(2): 89–102.

Božić B, Korać J, Stanković DM, Stanić M, Popović-Bijelić A, Bogdanović Pristov J, Spasojević I, Bajčetić M. Mechanisms of redox interactions

of bilirubin with copper and the effects of penicillamine. *Chem Biol Interact* 2017;278:129-134.

Božić B, Korać J, Stanković DM, Stanić M, Romanović M, Pristov JB, Spasić S, Popović-Bijelić A, Spasojević I, Bajčetić M. Coordination and redox interactions of β -lactam antibiotics with Cu^{2+} in physiological settings and the impact on antibacterial activity. *Free Radic Biol Med* 2018;129:279-285.

Brites D, Silva R, Brito A. Effect of bilirubin on erythrocyte shape and haemolysis, under hypotonic, aggregating or non-aggregating conditions, and correlation with cell age. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57(4):337-49.

Brito MA, Brondino CD, Moura JJ, Brites D. Effects of bilirubin molecular species on membrane dynamic properties of human erythrocytemembranes: a spin label electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Arch Biochem Biophys* 2001;387(1):57-65.

Brito MA, Silva R, Tiribelli C, Brites D. Assessment of bilirubin toxicity to erythrocytes. Implication in neonatal jaundice management. *Eur J Clin Invest* 2000;30:239-247.

Brodersen R, Stern L. Binding of bilirubin to albumin. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1980;11(4):305-399.

Buettner G. The packing order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993;300:535-543.

Bund T, Boggs JM, Harauz G, Hellmann N, Hinderberger D. Copper uptake induces self-assembly of 18.5 kDa myelin basic protein (MBP). *Biophys J* 2010;99:3020–3028.

Buonocore G. Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate* 2001;79:180–186.

Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother* 2013;19:549–559.

Bycroft BW, Shute RE. The molecular basis for the mode of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of resistance. *Pharm Res* 1985;2(1):3-14.

Cantu C, Huang W, Palzkill T. Selection and characterization of amino acid substitutions at residues 237-240 of TEM-1 beta-lactamase with altered substrate specificity for aztreonam and ceftazidime. *J Biol Chem* 1996;271(37):22538-45.

Chen J, Sun P, Zhou X, Zhang Y, Huang CH. Cu(II)-catalyzed transformation of benzylpenicillin revisited: the overlooked oxidation. *Environ Sci Technol* 2015; 49:4218–4225.

Chohan ZH, Pervez H, Khan KM, Rauf A, Supuran CT. Binding of Transition Metal Ions [Cobalt, Copper, Nickel and Zinc] with Furanyl-, Thiophenyl-, Pyrrolyl-, Salicylyland Pyridyl-Derived Cephalexins as Potent Antibacterial Agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2004;19(1):79–84.

Chohan ZH, Supuran CT, Scozzafava A. Metalloantibiotics: synthesis and antibacterial activity of cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of kefzol. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2004;19(1):79–84.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65(2): 232–260.

Cressman WA, Sugita ET, Doluisio JT, Niebergall PJ. Complexation of penicillins and penicilloic acids by cupric ion. *J Pharm Pharmacol* 1966;18:801–808.

Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28(5):771-99.

Dalecki AG, Crawford CL, Wolschendorf F. Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications. *Adv Microb Physiol* 2017;70:193-260.

Dalecki AG, Haeili M, Shah S, Speer A, Niederweis M, Kutsch O, Wolschendorf F. Disulfiram and copper ions kill *Mycobacterium tuberculosis* in a synergistic manner. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(8):4835-44.

Dani C, Martelli E, Bertini G, Pezzati M, Filippi L, Rossetti M, Rizzuti G, Rubaltelli FF. Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F119–F123.

Delangle P, Mintz E. Chelation therapy in Wilson's disease: from D-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu(I) chelators. *Dalton Trans* 2012;41:6359–6370.

Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2011;344:581–590.

Dimitrijević MS, Bogdanović Pristov J, Žižić M, Stanković DM, Bajuk-Bogdanović D, Stanić M, Spasić M, Hagen W, Spasojević I. Biliverdin-copper complex at physiological pH. *Dalton Trans* 2019;48(18):6061-6070.

Djoko KY, Goytia MM, Donnelly PS, Schembri MA, Shafer WM, McEwan AG. Copper(II)-bis(thiosemicarbazonato) complexes as antibacterial agents: insights into their mode of action and potential as therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:6444–6453.

Djoko KY, Achard MES, Phan MD, Lo AW, Miraula M, Prombhul S, Hancock SJ, Peters KM, Sidjabat HE, Harris PN, Mitić N, Walsh TR, Anderson GJ, Shafer WM, Paterson DL, Schenk G, McEwan AG, Schembri MA. Copper Ions and Coordination Complexes as Novel Carbapenem Adjuvants. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(2). pii: e02280-17.

Djoko KY, Ong CL, Walker MJ, McEwan AG. The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against Bacterial Pathogens. *J Biol Chem* 2015;290(31):18954-61.

Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem* 1935;112:51–65.

El-Gamel NEA. Metal chelates of ampicillin versus amoxicillin: synthesis, structural investigation, and biological studies. *J Coord Chem* 2010;63(3):534–543.

Eriksen EF, Danielsen H, Brodersen R. Bilirubin-liposome interaction. Binding of bilirubin dianion, protonization, and aggregation of bilirubin acid. *J Biol Chem* 1981;256:4269–4274.

Faggi E, Gavara R, Bolte M, Fajari L, Julia L, Rodriguez L, Alfonso I. Copper(II) complexes of macrocyclic and open chain pseudopeptidic ligands:

synthesis, characterization and interaction with dicarboxylates. *Dalton Trans* 2015;44(28):12700-10.

Feverly J. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver Int* 2008;28(5):592-605.

Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003;189:147-163

Gala L, Lawson M, Jomova K, Zelenicky L, Congradyova A, Mazur M, Valko M. EPR spectroscopy of a clinically active (1:2) copper(II)-histidine complex used in the treatment of Menkes disease: a Fourier transform analysis of a fluid CW-EPR spectrum. *Molecules* 2014;19(1):980-91.

Galvan-Tejada N, Bernes S, Castillo-Blum SE, Noth H, Vicente R, Barba-Behrens N. Supramolecular structures of metronidazole and its copper(II), cobalt(II) and zinc(II) coordination compounds. *J Inorg Biochem* 2002;91(1):339-48.

Garribba E, Micera G. The determination of the geometry of Cu(II) complexes: an EPR spectroscopy experiment. *J Chem Educ* 2006;83(8):1229.

Gazzin S, Vitek L, Watchko J, Shapiro SM, Tiribelli C. A Novel Perspective on the Biology of Bilirubin in Health and Disease. *Trends Mol Med* 2016;(9):758-768.

Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(5):1541-7.

Guo Y, Tsang DCW, Zhang X, Yang X. Cu(II)-catalyzed degradation of ampicillin: effect of pH and dissolved oxygen. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018;25(5):4279-4288.

Haas KL, Franz KJ. Application of Metal Coordination Chemistry to Explore and Manipulate Cell Biology. *Chem Rev* 2009;109(10):4921-4960.

Haeili M, Moore C, Davis CJ, Cochran JB, Shah S, Shrestha TB, Zhang Y, Bossmann SH, Benjamin WH, Kutsch O, Wolschendorf F. Copper complexation screen reveals compounds with potent antibiotic properties against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3727-3736.

Hagen W.R. *Biomolecular EPR spectroscopy*. Boca Raton: CRC Press, 2008.

Hagen WR. EPR spectroscopy as a probe of metal centres in biological systems. *Dalton Trans* 2006;37:4415–4434.

Hamdan II. Comparative in vitro investigations of the interaction between some macrolides and Cu(II), Zn(II) and Fe(II). *Pharmazie* 2003;58:223–224.

Hanko E, Tommarello S, Watchko JF, Hansen TW. Administration of drugs known to inhibit P-glycoprotein increases brain bilirubin and alters the regional distribution of bilirubin in rat brain. *Pediatr Res* 2003;54(4):441-5.

Hansen R, Gibson S, De Paiva Alves E, Goddard M, MacLaren A, Karcher AM, Berry S, Collie-Duguid ESR, El-Omar E, Munro M, Hold GL. Adaptive response of neonatal sepsis-derived group B *Streptococcus* to bilirubin. *Sci Rep* 2018;8(1):6470.

Hanson JC, Camerman N, Camerman A. Structure of a copper-isoniazid complex. *J Med Chem* 1981;24(11):1369-71.

Harrison JJ, Tremaroli V, Stan MA, Chan CS, Vacchi-Suzzi C, Heyne BJ, Parsek MR, Ceri H, Turner RJ. Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. *Environ Microbiol* 2009;11(10):2491-509.

Haynes WM. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 95th ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2014.

Hirayama K. *Handbook of Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Organic Compounds*, Plenum Press Data Division, New York, 1967.

Horsley ET, Burkitt MJ, Jones CM, Patterson RA, Harris LK, Moss NJ, del Rio JD, Leake DS. Mechanism of the antioxidant to pro-oxidant switch in the behavior of dehydroascorbate during LDL oxidation by copper(II) ions. *Arch Biochem Biophys* 2007;465(2):303-14.

Hu HW, Wang JT, Li J, Li JJ, Ma YB, Chen D, He JZ. Field-based evidence for copper contamination induced changes of antibiotic resistance in agricultural soils. *Environ Microbiol* 2016;18(11):3896-3909.

Hulzebos CV, Dijk PH. Bilirubin-albumin binding, bilirubin/albumin ratios, and free bilirubin levels: where do we stand? *Semin Perinatol* 2014;38(7):412-21.

Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Mol Biol Int* 2011;2011:594529.

Ince AT, Kayadibi H, Soylu A, Ovunc O, Gultepe M, Toros AB, Yasar B, Kendir T, Abut E. Serum copper, ceruloplasmin and 24-h urine copper evaluations in celiac patients. *Dig Dis Sci* 2008;53(6):1564-72.

Ishak R, Abbas O. Penicillamine Revisited: Historic Overview and Review of the Clinical Uses and Cutaneous Adverse Effects. *Am J Clin Dermatol* 2013;14:223–233.

Ivama VM, Rodrigues LNC, Guaratini CCI, Zanoni MVB. Spectrophotometric determination of cefaclor in pharmaceutical preparations. *Quím Nova* 1999;22:201–204.

Jayaraju D, Kondapi AK. Anti-cancer copper salicylaldehyde complex inhibits topoisomerase II catalytic activity. *Curr Sci* 2001;81:787–792.

Jezowska-Bojczuk M, Lesniak W, Szczepanik W, Gatner K, Jezierski A, Smoluch M, Bal W. Copper(II)-lincomycin: complexation pattern and oxidative activity. *J Inorg Biochem* 2001;84(3-4):189-200.

Kang SJ, Lee C, Kruzliak P. Effects of serum bilirubin on atherosclerotic processes. *Ann Med* 2014;46(3):138-47.

Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 2010;118(1):1-36.

Kubala-Kukus A, Bana D, Braziewicz J, Majewska U, Pajek M, Wudarczyk-Mocko J, Antczak G, Borkowska B, Gozdz S, Smok-Kalwat J. Analysis of copper concentration in human serum by application of total reflection X-ray fluorescence method. *Biol Trace Elem Res* 2014;158(1):22-28.

Lakatos L, Balla G, Pataki I, Vekerdy-Nagy Z, Oroszlan G. D-Penicillamine in the neonatal period: case reports. *Int J Med Pharm Case Rep* 2015;4:59–63.

Lakatos L, Balla G, Pataki I. New concept of bilirubin-induced neurologic dysfunction: neonatal brain insults of metal (copper) dyshomeostasis. *EC Pediatrics* 2016;3(1):281-288.

Lapshin SV, Alekseev VG. Copper(II) complexation with ampicillin, amoxicillin, and cephalexin. *Russ J Inorg Chem* 2009;54:1066–1069.

Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* 2013;11(6):371-84.

Lenicek M, Duricova D, Hradsky O, Dusatkova P, Jiraskova A, Lukas M, Nachtigal P, Vitek L. The relationship between serum bilirubin and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(3):481-7.

Lesniak W, Harris WR, Kravitz JY, Schacht J, Pecoraro VL. Solution chemistry of copper(II)-gentamicin complexes: relevance to metal-related aminoglycoside toxicity. *Inorg Chem* 2003;42(5):1420-9.

Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(5):371-387.

Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16(11):26087-26124.

Li X, Li H, Li S, Zhu F, Kim DJ, Xie H, Li Y, Nadas J, Oi N, Zykova TA, Yu DH, Lee MH, Kim MO, Wang L, Ma W, Lubet RA, Bode AM, Dong Z, Dong Z. Ceftriaxone, an FDA-approved cephalosporin antibiotic, suppresses lung cancer growth by targeting Aurora B. *Carcinogenesis* 2012;33(12):2548-57.

Li Y, Wang L, Schuchke DA, Zhou Z, Saari JT, Kang YJ. Marginal dietary copper restriction induces cardiomyopathy in rats. *J Nutr* 2005;135(9):2130-6.

Lowe J, Taveira-da-Silva R, Hilário-Souza E. Dissecting copper homeostasis in diabetes mellitus. *IUBMB Life* 2017;69:255-262.

Lutsenko S, Bhattacharjee A, Hubbard AN. Copper handling machinery of the brain. *Metallomics* 2010;2(9):595-608.

Maghzal G, Leck M, Collinson E, Li C, Stocker R. Limited role for the bilirubin biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *J Biol Chem* 2009;284:2951-2959.

Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 2004;114:297-316.

- Mancuso C. Bilirubin and brain: a pharmacological approach. *Neuropharmacology* 2017;118:113–123.
- Marsch D. *Handbook of Lipid Bilayers*, CRC Press, Boca Raton, 2013.
- McDonagh AF. The biliverdin-bilirubin antioxidant cycle of cellular protection: missing a wheel? *Free Radic Biol Med* 2010;49:814–820.
- Mesu JG, Visser T, Soulimani F, van Faassen EE, de Peinder P, Beale AM, Weckhuysen BM. New insights into the coordination chemistry and molecular structure of copper(II) histidine complexes in aqueous solutions. *Inorg Chem* 2006;45:1960–1971.
- Miller EL. The penicillins: a review and update. *J Midwifery Womens Health*. 2002;47(6):426-34.
- Mireles LC, Lum MA, Dennery PA. Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatr Res* 1999;45(3):355-62.
- Mojić M, Bogdanović Pristov J, Maksimović-Ivanić D, Jones DR, Stanić M, Mijatović S, Spasojević I. Extracellular iron diminishes anticancer effects of vitamin C: an in vitro study. *Sci Rep* 2014;4: 5955.
- Nam J, Lee Y, Yang Y, Jeong S, Kim W, Yoo JW, Moon JO, Lee C, Chung HY, Kim MS, Jon S, Jung Y. Is it worth expanding energy to convert biliverdin into bilirubin? *Free Radic Biol Med* 2018;124:232-240.
- Niebergall PJ, Hussar DA, Cressman WA, Sugita ET, Doluisio JT. Metal binding tendencies of various antibiotics. *J Pharm Pharmacol* 1966;18:729–738.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351–58.
- Ostrow JD, Mukerjee P. Revalidation and rationale for high pKa values of unconjugated bilirubin. *BMC Biochemistry* 2007;8:7.
- Ostrow JD, Pascolo L, Brites D, Tribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends Mol Med* 2004;10(2):65-70.

Ostrow JD, Pascolo L, Shapiro SM, Tiribelli C. New concepts in bilirubin encephalopathy. *Eur J Clin Invest* 2003;33(11):988-97.

Palmer JH, Wu JS, Upmacis RK. Coordination of metronidazole to Cu(II): structural characterization of a mononuclear square-planar compound. *J Mol Struct* 2015;1091:177–182.

Poole K. At the nexus of antibiotics and metals: the impact of Cu and Zn on antibiotic activity and resistance. *Trends Microbiol* 2017;25(10):820-832.

Pourahmad J, O'Brien PJ. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology* 2000;143(3):263-73.

Poyton MF, Sendeki AM, Cong X, Cremer PS. Cu(2+) Binds to phosphatidylethanolamine and increases oxidation in lipid membranes. *J Am Chem Soc* 2016;138:1584–1590.

Pra D, Franke SI, Giulian R, Yoneama ML, Dias JF, Erdtmann B, Henriques JA. Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *Biometals* 2008;21(3):289-97.

Pretsch E, Buhlmann P, Badertscher M. *Structure Determination of Organic Compounds*, 4th ed, Springer-Verlag, Berlin, 2009.

Qureshi MJ, Kumar M. D-Penicillamine for preventing retinopathy of prematurity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;(9):CD001073.

Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 1999;284:805-808.

Rangel M, Leite A, Silva AMN, Moniz T, Nunes A, Amorim MJ, Queiros C, Cunha-Silva L, Gameiro P, Burgess J. Distinctive EPR signals provide an understanding of the affinity of bis-(3-hydroxy-4-pyridinonato) copper(II) complexes for hydrophobic environments. *Dalton Trans* 2014;43:9722–9731.

Rao M, Liu H, Yang M, Zhao C, He ZG. A copper-responsive global repressor regulates expression of diverse membrane-associated transporters and bacterial drug resistance in *Mycobacteria*. *J Biol Chem* 2012;287(47): 39721–39731.

Reddy PV, Rao KV, Norenberg MD. The mitochondrial permeability transition, and oxidative and nitrosative stress in the mechanism of copper toxicity in cultured neurons and astrocytes. *Lab Invest* 2008;88(8):816-30.

Rennie JM, Beer J, Upton M. Learning from claims: hyperbilirubinemia and kernicterus. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2019;104(2):F202-F204.

Reybier K, Ayala S, Alies B, Rodrigues JV, Bustos Rodriguez S, La Penna G, Collin F, Gomes CM, Hureau C, Faller P. Free superoxide is an intermediate in the production of H₂O₂ by copper(I)-A β peptide and O₂. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016;55(3):1085–1089.

Rosenzweig AC. Bioinorganic chemistry: zeroing in on a new copper site. *Nat Chem* 2009;1:684–685.

Rouault TA, Cooperman S. Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:142–148.

Sakurai H, Shimomura S, Ishizu K. Green and purple copper (II)-chloramphenicol complexes in methanol: evidence for the coordination of deprotonated amide nitrogen. *Antibiot (Tokyo)* 1980;33(4):458-9.

Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev* 2014;114(1):815-62.

Savini I, D'Alession S, Giartosio A, Morpurgo L, Avigliano L. The role of copper in the stability of ascorbate oxidase towards denaturing agents. *Eur J Biochem* 1990;190(3):491-5.

Scheiber IF, Mercer JF, Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain. *Prog Neurobiol* 2014;116:33–57.

Schulpis KH, Karakonstantakis T, Gavrili S, Costalos C, Romac E, Papassotiriou I. Serum copper is decreased in premature newborns and increased in newborns with hemolytic jaundice. *Clin Chem* 2004;50:1253–1256.

Santos S, Silva AM, Matos M, Monterio SM, Alvaro AR. Copper induces apoptosis in Caco-2 and Hep-G2 cells: Expression of caspases 3, 8 and 9, AIF and p53.

Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin Benefits: Cellular Protection by a Biliverdin Reductase Antioxidant Cycle. *Pediatrics* 2004;113(6):1776-82.

Shepard EM, Dooley DM. Inhibition and oxygen activation in copper amine oxidases. *Acc Chem Res* 2015;48(5):1218-26.

Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 1998;16(7):387-98.

Solano F. On the metal cofactor in the tyrosinase family. *Int J Mol Sci* 2018;19(2):633.

Sousa CF, Ferreira M, Abreu B, Medforth CJ, Gameiro P. Interactions of a non-fluorescent fluoroquinolone with biological membrane models: A multi-technique approach. *Int J Pharm* 2015;495(2), 761–770.

Spasojević I, Mojović M, Stević Z, Spasić SD, Jones DR, Morina A, Spasić MB. Bioavailability and catalytic properties of copper and iron for Fenton chemistry in human cerebrospinal fluid. *Redox Rep* 2010;15(1):29-35.

Spasojevic I. Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48:114–142.

Stankovic DM, Mehmeti E, Kalcher K. Development of sensitive analytical approach for the quantification of α -lipoic acid using boron doped diamond electrode. *Anal Sci* 2016;32:847–851.

Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World J Gastroenterol* 2013;19(38):6398-6407.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;235(4792):1043-6.

Swiatek M, Valensin D, Miglirini C, Gaggelli E, Valensin G, Jezowska-Bojczuk M. Unusual binding ability of vancomycin towards Cu^{2+} ions. *Dalton Trans* 2005;7(23): 3808–3813.

Szczepanik W, Dworniczek E, Ciesiołka J, Wrzesiński J, Skala J, Jezowska-Bojczuk M. In vitro oxidative activity of cupric complexes of kanamycin A in comparison to in vivo bactericidal efficacy. *J Inorg Biochem* 2003;94(4):355-64.

Szczepanik W, Kaczmarek P, Jezowska-Bojczuk M. Oxidative activity of copper(II) complexes with aminoglycoside antibiotics as implication to the toxicity of these drugs. *Bioinorg Chem Appl* 2004;55-68.

- Tehrani KHME, Martin NI. β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: an update. *Medchemcomm* 2018;9(9):1439-1456.
- Telianidis J, Hung JH, Materia S, Fontaine SL. Role of the P-type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Front Aging Neurosci* 2013;5:44.
- Tipper DJ. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther* 1985;27:1-35.
- Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem* 2005;74:563-93.
- van den Broek P, Verkade HJ, Hulzebos CV. Hyperbilirubinemia in infants with Gram-negative sepsis does not affect mortality. *Early Human Development* 2011;87(8):515–519.
- Viktorinova A. Current insights on the role of iron and copper dyshomeostasis in the pathogenesis of bilirubin neurotoxicity. *Life Sci* 2017;191:34–45.
- Walshe JM. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am J Med* 1956;21:487–495.
- Wasowicz W, Wolkanin P, Bednarski M, Gromadzinska J, Sklodowska M, Grzybowska K. Plasma trace element (Se, Zn, Cu) concentration in maternal and umbilical cord blood in Poland. Relation with birth weight, gestational age, and parity. *Biol Trace Elem Res* 1993;38:205–215.
- Weil JA, Bolton JR. *Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*. second ed., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2007.
- Weinshilboum R, Axelrod J. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ Res* 1971;28:307-315.
- Wennberg RP, Ahlfors CE, Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Toward understanding kernicterus: a challenge to improve the management of jaundiced newborns. *Pediatrics* 2006;117(2):474-85.
- Wennberg RP. The importance of free bilirubin acid salt in bilirubin uptake by erythrocytes and mitochondria. *Pediatr Res* 1988;23(4):443-7.

Yamamoto K, Ishihama A. Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in Escherichia coli. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70(7):1688-95.

Yigit S, Yurdakok M, Kilinc K, Oran O, Erdem G, Tekinalp G. Serum malondialdehyde concentrations in babies with hyperbilirubinemia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;80:F235-7.

Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K. Reaction mechanism of mammalian mitochondrial cytochrome c oxidase. *Adv Exp Med Biol* 2012;748:215-36.

Zhao Y, Tan Y, Guo Y, Gu X, Wang X, Zang Y. Interactions of tetracycline with Cd (II), Cu (II) and Pb (II) and their cosorption behavior in soils. *Environ Pollut* 2013;180:206-13.

Zhao Z, Zhang J, Wang M, Wang Z, Wang L, Ma L, Huang X, Li Z. Structure advantage and peroxidase activity enhancement of deuterohemin-peptide-inorganic hybrid flowers. *RSC Adv* 2016;6:104265.

Lista skraćenica

6 APA – 6 aminopeniciloińska kiselina

7 ACA – 7 aminocefalosporinska kiselina

ARG – antibiotski geni rezistencije (antibiotic resistance genes)

ATP – adenzin trifosfat

BR – bilirubin

CAT – katalaza

Co – kobalt

CTR – transporter bakra

Cu – bakar

CV – ciklična voltometrija

DMPC – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolin

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

D-PA – D-penicilamin

EDTA – etilen diamino tetra sirćetna kiselina

EPR – elektron paramagnetna rezonancija

FDA – Uprava za hranu i lekove (Food and Drug Administration)

Fe – gvožđe

H₂O – voda

H₂O₂ - vodonik peroksid

HCL – hlorovodonična kiselina

Hg – živa

HSAB – teorija tvrdih i mekih kiselina i baza (hard and soft acids and bases)

KCL – kalijum hlorid

KEAP1 – Kelchlike ECH-associated protein 1

KPP – fosfatni pufer, KH_2PO_4

MDA – malondialdehid

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

NaCL – natrijum hlorid

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

ROS – reaktivne kiseonične vrste (reactive oxygen species)

SD – standardna devijacija

SDS – natrijum dodecil sulfat

TBA – tiobarbituratna kiselina

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometan

UV-VIS – ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija

Zn – cink

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Bojana Božić Cvijan je rođena 24.07.1987. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, 2012 godine sa prosečnom ocenom 9.48. Specijalističke akademske studije, smer Klinička farmakologija i terapija je upisala na Medicinskom fakultetu u Beogradu školske 2013/2014 godine, a završni akademski rad "Indikatori upotrebe antibiotika u pedijatrijskoj populaciji u Republici Srbiji od 2011. do 2013. godine" je odbranjen 2014. godine. Osnovnu zdravstvenu specijalizaciju iz kliničke farmakologije je upisala 2014. godine. Od 2013. godine je zaposlena na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju na Medicinskom fakultetu Univerzitetu u Beogradu, prvo kao saradnik u nastavi, a od 2015. godine kao asistent prof. dr Milice Bajčetić.

Od 2016. godine je istraživač na projektu FP7 "Labeling of Enalapril from Neonates up to Adolescents", ID: 602295, Univerzitetska dečja klinika, Tiršova, koordinator prof. dr Milica Bajčetić. Od 2013. godine je istraživač na projektu "Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patologiji", Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj 173014, rukovodilac dr Duško Blagojević.

Prvi je autor u ukupno 5 radova sa JCR, 3 rada M21, 1 rad M22 i 1 rad iz M23 kategorije. Autor je rada u časopisu koji nije indeksiran (1); rada u zborniku sa nacionalnog skupa (1); izvoda sa međunarodnog skupa (3); izvoda sa nacionalnog skupa (4); poglavlja u knjigama (4). Učestvovala je kao izlagač na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Dobitnica je plakete za najbolje usmeno saopštenje na Drugom kongresu pedijatarata Srbije sa međunarodnim učešćem održanom u Beogradu 2014. godine.

Član je Srpskog Farmakološkog Društva i European Society for Developmental Perinatal and Paediatric Pharmacology (ESDPPP).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Bojana Božić Cvijan

broj upisa MF-06/14

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„*In vitro* interakcije jona bakra sa bilirubinom i β -laktamskim antibioticima“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.07.2019.

Bojana Božić Cvijan

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Bojana Božić Cvijan

Broj upisa MF-06/14

Studijski program Medicinska farmakologija

Naslov rada „*In vitro* interakcije jona bakra sa bilirubinom i β -laktamskim antibioticima“

Mentor prof. dr Milica Bajčetić

Potpisani

BOJANA BOŽIĆ CVIJAN

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.07.2019.

Bojana Božić Cvijan

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„*In vitro* interakcije jona bakra sa bilirubinom i β -laktamskim antibioticima“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

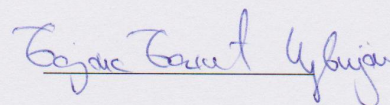
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.07.2019.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.