

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.06.2019. godine, broj 9700/04-BC, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„*In vitro* interakcije jona bakra sa bilirubinom i  $\beta$ -laktamskim antibioticima”**

kandidata Bojane Božić Cvijan, zaposlena u Institutu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu. Mentor je prof dr Milica Bajčetić, a komentor naučni savetnik dr Ivan Spasojević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

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

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija Bojane Božić Cvijan napisana je na ukupno 81 strani i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, cilj, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi 1 tabela i 12 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i listu skraćenica.

U prvom delu **uvoda** je opisana uloga jona bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) i značaj njegove adekvatne koncentracije u ljudskom organizmu. Navedeni su i opisani do sada svi poznati mehanizmi toksičnog delovanja jona bakra (redoks reakcije i stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta; reakcije sa molekulima tiola i indirektno stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta; formiranje koordinacionih kompleksa sa organskim i neorganskim ligandima). Napravljen je i kratki osvrt na do sada zabeležen uticaj jona bakra na pojavu bakterijske rezistencije.

U drugom delu uvoda su opisani ključni rezultati do sada objavljenih studija o interakcijama jona bakra sa antibioticima. Posebno poglavlje je posvećeno interakcijama jona bakra sa pojedinim  $\beta$ -laktamskim antibioticima. Opisane su do sada poznate *in vitro* promene u fizičko-hemijskim karakteristikama i stabilnosti antibiotika kao i krajnji efekti na antibakterijsko delovanje  $\beta$ -laktamskih antibiotika u prisustvu jona bakra.

Opisani su struktura i efekti bilirubina (BR). Posebno je objašnjen značaj metalom indukovano oksidativnog stresa u nastanku neurotoksičnosti izazvane BR.

**Ciljevi** rada su jasno definisani u četiri tačke. Prvi je utvrđivanje mehanizma redoks interakcija BR i bakra. Drugi cilj je analiza redoks interakcija BR i penicilamin-vezanog bakra. Treći cilj je analiza redoks interakcija jona bakra sa  $\beta$ -laktamskim antibioticima (penicilin G, ampicilin, amoksicilin, cefaleksin, cefaklor, ceftriakson, ceftazidim i meropenem). Kao četvrti cilj je navedena analiza uticaja jona bakra na inhibitorne efekte  $\beta$ -laktamskih antibiotika na sojevima *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*.

U poglavlju **materijal i metode** detaljno je opisan dizajn *in vitro* eksperimenata. U *in vitro* eksperimentima su korišćene supstance analitičke čistoće, rastvori su spremni svaki dan i po potrebi zaklanjani od svetlosti. Ultraljubičasta-vidljiva (UV-VIS) spektroskopija je korišćena u cilju kvantitativnog određivanja jona bakra, opisa njegovih hemijskih veza i proceni stabilnosti i strukture kompleksa koji pomenuti jon gradi sa BR i  $\beta$ -laktamskim antibioticima. Potrošnja kiseonika u reakcijama jona bakra sa BR i  $\beta$ -laktamskim antibioticima je praćena pomoću Klarkove kiseonične elektrode. Detaljno je opisana elektron paramagnetna rezonancija (EPR) koja predstavlja metodu izbora za ispitivanje strukture, karakteristika, orijentacije i dinamike kompleksa jona bakra. Opisane su ciklična voltometrija (CV) i diferencijalna pulsna voltometrija kao metode koje pružaju informacije o redoks potencijalu jona bakra kao i o kinetici elektrona pri reakcijama sa BR i  $\beta$ -laktamskim antibioticima. Opisana je metoda za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) u cilju

ispitivanja uticaja jona bakra na antibakterijsku aktivnost  $\beta$ -laktamskih antibiotika na sojevima *E. coli* i *S. aureus*. Detaljno su opisane metode za određivanje ekstracelularnog malondialdehida (MDA) i hemoglobina kao markera lipidne peroksidacije i hemolize.

Opisan je adekvatan metod za statističku obradu rezultata. Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

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. 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.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 161 reference.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Prilikom praćenja reakcije BR i jona bakra na UV-VIS spektroskopiji uočeno je smanjenje apsorbance u odnosu na početnu, pomeranje maksimalne apsorbance od 415nm ka 400nm (nakon 30 minuta) kao i pojava dodatnog pika ( $\lambda=330$  nm). Tokom daljeg praćenja zabeleženo je opadanje apsorbance sa pojavom porasta apsorbance na 655 nm. Opaženi rezultati govore u prilog bakrom indukovane degradacije BR. Tokom snimanja spektra samog BR dobijen je očekivani rezultat ( $\lambda= 435$ nm) i uočeno je blago smanjenje u intenzitetu spektra tokom posmatranja što se može pripisati foto-degradaciji. Slični rezultati su dobijeni i analizom ponašanja BR u prisustvu gvožđa.

Korišćenjem CV dobijeni su strujni pikovi ( $i_p$ ) anodnog i katodnog potencijala ( $E_{pa}$  i  $E_{pc}$ ) za  $Cu^{2+}$  i  $Cu^{1+}$ . Slabiji strujni pikovi su zabeleženi u sistemu BR i  $Cu^{2+}$ . Glavne razlike u strujnim pikovima 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  $\text{Cu}^{2+}$  struja. Korišćenjem diferencijalne pulsne voltametrije uočava se da je koncentracija preostalog  $\text{Cu}^{2+}$  u sistemu 0.4 mM  $\text{Cu}^{2+}$  i 0.2 mM BR  $0.25 \pm 0.04$  mM što upućuje na 1:1 stehiometrijski odnos.

EPR spektar  $\text{Cu}^{2+}$  je aksijalne simetrije sa jakom  $g_{\perp}$  linijom i četiri slabe linije  $g_{\parallel}$  ( $g_{\parallel} = 2.40$ ). U prisustvu BR intenzitet signala se smanjuje, dolazi do širenja  $g_{\perp}$  i gubitka hiperfinog cepanja. Prisustvo  $\text{Cu}^{2+}$  se i dalje očitava jer je deo  $\text{Cu}^{2+}$  vezan za fosfatni pufer i nije dostupan za BR. U sistemu  $\text{Cu}^{2+}$  i penicilamin (PA) uočen je širi signal PA vezanog  $\text{Cu}^{2+}$  i signal  $\text{Cu}^{2+}$  u fosfatnom puferu. Inkubacija sa BR je dovela do smanjenja signala slobodnog  $\text{Cu}^{2+}$ , ali sa minimalnim uticajem na  $\text{Cu}^{2+}$ -PA kompleks. Signal  $\text{Cu}^{2+}$  u prisustvu lipozoma je sličan kao signal  $\text{Cu}^{2+}$  u fosfatnom puferu, dok se u prisustvu BR signal ne menja značajnije, ali se opaža širenje  $g_{\perp}$  linije.

Primenom oksimetrije, u reakciji BR i  $\text{Cu}^{2+}$  uočen je pad u koncentraciji kiseonika. Poređenjem sistema  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] > 1$  sa  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] = 1$  uočeno je samo blago povećanje u potrošnji kiseonika ( $142 \pm 4$   $\mu\text{M}$  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  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] = 1$ . Analiza je ukazala da prelazni kompleks  $\text{Cu}^{2+}/\text{BR}$  reaguje sa molekulskim kiseonikom u 1:1 stehiometriji. Uvođenjem PA u sistem  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{BR}] = 1$  opaženo je značajno smanjenje potrošnje kiseonika ( $80 \pm 15$   $\mu\text{M}$ ;  $p = 0.040$ ). Dodatkom katalaze (CAT) u sistem 0.2 mM  $\text{Cu}^{2+}/0.2$  mM BR nastala koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $33 \pm 11$   $\mu\text{M}$ ;  $p = 0.044$ .

Opisana je pojava lipidne peroksidacije i hemolize: MDA u prisustvu  $\text{Cu}^{2+} \sim 15$   $\mu\text{M}$ , u prisustvu BR  $\sim 13$   $\mu\text{M}$ , a u sistemu  $\text{Cu}^{2+}$ -BR  $\sim 20$   $\mu\text{M}$ , u sistemu  $\text{Cu}^{2+}$ -BR-PA  $\sim 15$   $\mu\text{M}$ . Statistički značajno veće oštećenje eritrocita i veća produkcija MDA je opažena u sistemu  $\text{Cu}^{2+}$  zajedno sa BR (ekvimolarni odnos; 10  $\mu\text{M}$ :10  $\mu\text{M}$ ) (jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Dankanovim testom  $p < 0.05$ ). Primena PA smanjuje oštećenje ali markeri lipidne peroksidacije i hemolize su i dalje povišeni u odnosu na kontrolne vrednosti.

U drugom delu rezultata analizirane su interakcije  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\beta$ -laktamskih antibiotika. Tokom 60 minuta praćenja spektar penicilina G se nije promenio u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$ . U sistemima  $\text{Cu}^{2+}$ -ampicilin i  $\text{Cu}^{2+}$ -amoksicilin opažena je apsorbanca na  $\sim 310$  nm i apsorbanca slabijeg intenziteta na 645 nm. Posmatranjem cefaleksina i cefaklora u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  uočena je  $\lambda_{\text{max}} \sim 310$  nm, ali i nestanak apsorbanca na  $\sim 265$  nm kao i pojava novog pika tokom vremena na

~400 nm. Spektar ceftriaksona se nije promenio u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$ , apsorbcioni maksimum je tokom 60 minuta praćenja ostao 240 nm i 268 nm. Takođe, spektar ceftazidima se nije promenio u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$ , sa apsorbcionim maksimumom na 255 nm. Apсорbcioni maksimum meropenema se inicijalno nije promenio u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\lambda=298$  nm), ali je tokom vremena posmatranja počeo da opada.

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

EPR spektri ispitivanih  $\beta$ -laktamskih antibiotika i  $\text{Cu}^{2+}$  su imali sličan izgled u ispitivanim 1:1 i 2:1 odnosima. Karakterističan EPR spektar  $\text{Cu}^{2+}$  se nije promenio u prisustvu penicilina G. Slična geometrija i distorzija je opažena analizom kompleksa  $\text{Cu}^{2+}$  sa ampicilinom, amoksicilinom i cefaleksinom, ali sa 1.5 puta jačim signalom. Analizom ponašanja  $\text{Cu}^{2+}$  u puferu uočeno je 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  $\text{Cu}^{2+}$ . Jači intenzitet spektara koji po obliku nisu izmenjeni je ukazao da ovi antibiotici formiraju komplekse sa  $\text{Cu}^{2+}$  koji su slične geometrije kao sa fosfatnim jonima, ali i da pomenuti antibiotici povećavaju rastvorljivost bakra pri fiziološkoj pH. EPR spektar  $\text{Cu}^{2+}$  je značajno drugačiji u prisustvu ceftriaksona što je ukazalo na formiranje koordinacionog kompleksa drugačije geometrije u odnosu na jone bakra koordinisane fosfatnim jonima. Analizom EPR spektra  $\text{Cu}^{2+}$  i ceftazidima uočene su vrednosti  $g_{\parallel}=2.39$ ,  $g_{\perp}=2.07$  i dodatni signal  $g=1.99$ . Glavni signal je ostao sa oktaedralnom orijetacijom i tetragonalnom distorzijom. 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).

CV  $\text{Cu}^{2+}$  pokazala je slabe strujne pikove. Kompleksi jona bakra sa ampicilinom, amoksicilinom i cefaleksinom su doveli do značajnog povećanja strujnih pikova i blagog povećanja  $E_{pa}$ . Pojačanje struja ide u prilog povećanoj rastvorljivosti jona bakra i u skladu je sa EPR rezultatima. Ceftriakson i ceftazidim nisu značajnije uticali na  $i_p$ . Nakon pet minuta inkubacionog perioda sa cefaklorom opažen je značajan porast  $i_p$ . Analizom sistema  $\text{Cu}^{2+}$ -meropenem je uočen centralno pozicionirani ligand sa značajnim porastom  $i_p$  koji se tokom vremena smanjio. U slučaju samog meropenema  $E_{pa}$  je iznosila 1060 mV, dok je u slučaju  $\text{Cu}^{2+}$ -meropenem iznosila 985 mV, ukazujući na sulfidnu grupu kao potencijalno mesto oksidacije.

Analizom MIK je uočena značajno slabija aktivnost meropenema u prisustvu jona bakra protiv sojeva *E. coli* i *S. aureus*. Formiranjem kompleksa sa bakrom aktivnost amoksicilina i ceftriaksona je oslabljena protiv *E. coli* i *S. aureus*, a aktivnost ampicilina protiv *E. coli*. Aktivnost cefaleksina i cefaklora u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  je blago poboljšana protiv *E. coli*. U prisustvu jona bakra aktivnost penicilina G je smanjena protiv *S. aureus*. MIK ceftazidima se nije značajnije promenila u prisustvu jona bakra.

### C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U pogledu analize *in vitro* interakcija  $\text{Cu}^{2+}$  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  $\text{Cu}^{2+}$  dovodi do ireverzibilne razgradnje molekula BR (McDonagh, 2010). U prikazanim rezultatima opaža se smanjenje apsorbance prilikom ispitivanja sistema BR: $\text{Cu}^{2+}$  tokom vremena. Analizom promena u apsorbanci uočene su 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 prikazanim rezultatima takođe je registrovana mala koncentracija biliverdina  $\sim 20\mu\text{M}$ . Analizom sistema  $\text{Fe}^{3+}$  i BR uočeno je nepostojanje koordinativnih i redoks interakcija što se može staviti u kontekst Pearsonovog principa (Hass i Franz, 2009).

U pogledu CV, uočeni su očekivani strujni pikovi za  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{1+}$  (Haynes, 2014). Opaža se vremenski zavisno opadanje strujnog pika  $\text{Cu}^{1+}$  i istovremeni porast strujnog pika  $\text{Cu}^{2+}$ . Analizom pikova se zaključuje da BR dovodi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  i stvaranja  $\text{Cu}^{1+}$  koji potom podleže spontanoj oksidaciji i ponovnim stvaranjem  $\text{Cu}^{2+}$ . Imajući u vidu da je koncentracija redukovanog  $\text{Cu}^{2+}$  slična koncentraciji BR potrebnog za redukciju proizilazi da je odnos u ovom sistemu 1:1, čemu u prilog govore i prethodna istraživanja (Asad i sar., 2001; Adhikari i sar., 1998).

EPR spektar dvovalentnog jona bakra ima karakterističan izgled:  $g_{\perp}$  u aksijalnoj simetriji i četiri EPR linije duž  $g_{\parallel}$  koje potiču od hiperfinog cepanja izotopa  $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$  ( $I=3/2$ ) (Hagen, 2006). Promene u jačini signala se jasno učitavaju nakon dodatka BR sistemu, što ukazuje na pojavu BR indukovane redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  i još jednom upućuje na nepostojanje  $\text{Cu}^{2+}$ -BR kompleksa. S obzirom da je u EPR eksperimentima korišćen fosfatni pufer, deo  $\text{Cu}^{2+}$  ostaje u obliku nerastvorljivih fosfata i kao takav nije dostupan BR indukovanoj redukciji. Signal preostalog  $\text{Cu}^{2+}$  u prisustvu BR pokazuje specifičan EPR izgled, u pogledu šire  $g_{\perp}$  linije i

gubitka hiperfinog cepanja, što se može objasniti anizotropijskim interakcijama ili još uvek nedovoljno objašnjenom hiperfinom strukturom  $\text{Cu}^{2+}$  u čvrstom stanju (Weil i Boltron, 2007). U prisustvu PA dolazi do širenja signala heliranog  $\text{Cu}^{2+}$  verovatno kao rezultat dipolarnih interakcija između paramagnetnih centara šest atoma  $\text{Cu}^{2+}$  u PA-  $\text{Cu}^{2+}$  klasteru (Birker i Freeman, 1977). Druga komponenta EPR signala se odnosi na već opisani signal  $\text{Cu}^{2+}$  u fosfatnom puferu. Inkubacijom sa BR uočava se smanjenje signala slobodnog  $\text{Cu}^{2+}$ , dok je u slučaju  $\text{Cu}^{2+}$ -PA uticaj minimalan što govori u prilog činjenici da je  $\text{Cu}^{2+}$  u klasteru nedostupan za BR. Zbog opažene sličnosti EPR spektra  $\text{Cu}^{2+}$  vezanog za liposome i  $\text{Cu}^{2+}$  u fosfatnom puferu može se pretpostaviti da se vezivanje dešava preko fosfatne grupe.  $\text{Cu}^{2+}$  vezan za fosfolipide je ostao nedostupan za BR, pri čemu se nastale promene u EPR signalu 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  $\text{Cu}^{2+}$ .

Pri fiziološkim uslovima oksidacijom  $\text{Cu}^{1+}$  nastaje  $\text{Cu}^{2+}$  uz istovremeno stvaranje superoksidnog anjona koji se potom redukuje do vodonik peroksida (Reyber i sar., 2016). Rezultati dobijeni na kiseoničnoj elektrodi su pokazali da sistem BR i  $\text{Cu}^{2+}$  dovodi do značajne potrošnje kiseonika i potvrdili su 1:1 stehiometrijski odnos u sistemu. Prisustvo PA u sistemu značajno smanjuje potrošnju kiseonika čime se potvrđuje njegova uloga u heliranju prooksidativnih metala i uklanjanju slobodnih radikala (Qureshi i Kumar, 2013). Iako se delovanjem katalaze veliki deo kiseonika ponovo javlja u sistemu, određena koncentracija vodonik peroksida se gubi preko reakcije sličnoj Fentonovoj ( $\text{Cu}^{1+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{OH} + \text{OH}^-$ ) (Spasojević i sar., 2010).

Opisani rezultati o nastanku lipidne peroksidacije i oštećenja eritrocitne membrane sinergističkim delovanjem  $\text{Cu}^{2+}$  i BR su u skladu sa literaturnim podacima (Brites i sar., 1997; Horsley i sar., 2007). S obzirom da je  $\text{Cu}^{2+}$  vezan za liposome nedostupan za redukciju izazvanu BR, 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. PA smanjuje prooksidativnu aktivnost  $\text{Cu}^{2+}$  ali nema 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  $\sim 20$  nM (Hulzebos i Dijk, 2014), značajnije posledice mogu se očekivati od sinergističkog efekta  $\text{Cu}^{2+}$  i BR u odnosu na sam direktni uticaj BR.

U pogledu  $\beta$ -laktamskih antibiotika i  $\text{Cu}^{2+}$  uočava se izostanak interakcija između penicilina G i  $\text{Cu}^{2+}$ . Suprotno tome, UV-VIS spektar ampicilina, amoksicilina i cefaleksina ukazuje na formiranje stabilnih obojenih kompleksa sa  $\text{Cu}^{2+}$ . Ovaj rezultat je od velike važnosti kada se zna da je razlika između penicilina G i pomenuta tri antibiotika u  $\text{NH}_2$  grupi bočnog lanca što upućuje na zaključak da je upravo ova grupa i mesto koordinativnih interakcija sa jonima bakra. U slučaju amoksicilina uočava se i karakteristična  $\lambda$  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 označen je N u amidnoj grupi. Analizom literature uočeno je da se vezivanje cefaleksina i jona bakra odvija preko amino, karboksilne i amid karbonilne grupe ali u uslovima kada je kao rastvarač korišćen metanol (Anaconda i Rodriguez, 2004). Tokom perioda praćenja spektra cefaleksina i cefaklora  $\text{Cu}^{2+}$ , jasno se uočava nestanak  $\lambda_{\text{max}}$  265 nm i pojava novog pika na  $\sim 400$  nm što ukazuje na degradaciju pomenutih antibiotika u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$ . Prethodna studija je pokazala da  $\lambda_{\text{max}}$  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  $\text{Cu}^{2+}$ . Verovatno je da  $\text{Cu}^{2+}$  ne intereaguje sa najjačim hromoforama ovih antibiotika. Prema opisanim rezultatima ceftazidim i  $\text{Cu}^{2+}$  ne intereaguju na nivou aminotiazolnog prstena, ali su rezultati dobijeni spektroskopijom nedovoljno jasni da bi se izveo zaključak o mogućim interakcijama ceftriaksona i  $\text{Cu}^{2+}$  na nivou aminotiazolnog prstena. Stvaranje koordinativnih veza između ketoksamin grupe ( $\lambda \sim 190$  nm) ova dva antibiotika i  $\text{Cu}^{2+}$  (Hirayama, 1967; Jayaraju i Kondapi, 2001), opisano u literaturi se ovde ne uočava. U slučaju meropenema uočava se vremenski zavisno opadanje signala u prisustvu jona bakra što upućuje na zaključak da se odigrava degradacija meropenema.

Korišćenjem oksimetrije samo u sistemu  $\text{Cu}^{2+}$ -cefklor se opaža značajna potrošnja kiseonika i akumulacija vodonik peroksida. Iako se meropenem razgrađuje u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  ne beleži se potrošnja kiseonika što implicira da meropenem ne podleže oksidaciji ili da ima ulogu stabilizatora  $\text{Cu}^{1+}$ .

Analizom EPR spektroskopije potvrđen je 1:1 molarni odnos  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\beta$ -laktamskih antibiotika prethodno opisan UV-VIS spektroskopijom. Takođe još jednom je potvrđeno da penicilin G ne stvara kompleks sa  $\text{Cu}^{2+}$  pri fiziološkim uslovima. Dobijeni EPR spektri ampicilina,



amoksicilina i cefaleksina u kompleksu sa jonima bakra upućuju na očuvanu oktaedraelnu geometriju sa tetragonalnom distorzijom i na blago smanjenje anizotropije. Dobijeni jači intenzitet signala se objašnjava povećanom rastvorljivošću jona bakra u prisustvu tri pomenuta antibiotika. Suprotno ovome, EPR spektar  $\text{Cu}^{2+}$  je značajno promenjen u prisustvu ceftriaksona što se može tumačiti formiranjem koordinativnog kompleksa ali ovaj put drugačije geometrije u odnosu na opisanu geometriju  $\text{Cu}^{2+}$  u fosfatnom puferu. Kao vezno mesto predložen je atom azota u amidnoj i ketoksamin grupi (Santini i sar., 2014). Analizom ponašanja ceftazidima i  $\text{Cu}^{2+}$  uočena je karakteristična orijentacija i distorzija. Moguće vezivanje  $\text{Cu}^{2+}$  za ceftazidim je preko atoma kiseonika u deprotonisanoj karboksilnoj grupi dihidrotiazinskog prstena što je praćeno otvaranjem prstena i stvaranjem organskog radikala. Analizom strujnih pikova nastalih u kompleksu  $\text{Cu}^{2+}$  sa ampicilinom, amoksicilinom i cefaleksinom potvrđuje se uloga tri pomenuta antibiotika u povećanju rastvorljivosti bakra u fosfatnom puferu pri fiziološkim uslovima. U pogledu cefaklora, opisano je da u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  elektronegativni atom Cl povlači elektrone iz cefalosporinskog prstena čime dovodi do destabilizacije prstena i redukcije bakra do  $\text{Cu}^{1+}$ . Analizom CV meropenema uočene su vrednosti potencijala koje su u literaturi već opisane i pripisane ireverzibilnoj oksidaciji sulfidne grupe (Stankovic i sar., 2016), dok se u prisustvu jona bakra, potencijal u sistemu menja označavajući sulfidnu grupu kao ključno mesto oksidacije.

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 rezultatima nisu zabeležene interakcije između penicilina G i jona bakra, promene u antibakterijskoj aktivnosti mogu se 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 rezultatima iz literature po kojima je aktivnost ampicilina i amoksicilina poboljšana u prisustvu jona bakra protiv *E. Coli* (Gamel, 2010) su opažanja o značajno nižoj antimikrobnoj sposobnosti ampicilina i amoksicilina nakon formiranja kompleksa sa metalnim jonom. U pogledu kompleksa  $\text{Cu}^{2+}$ -cefaleksin uočeno blago poboljšanje aktivnosti u odnosu na sam cefaleksin protiv *E. coli* je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Auda i sar., 2008; Chohan i sar., 2004; Ali, 2011). Blago poboljšanje aktivnosti cefaklora u

kompleksu sa jonima bakra protiv *E. coli* se može povezati sa osobinom cefaklora da redukuje  $\text{Cu}^{2+}$  što je praćeno stvaranjem vodonik peroksida koji može doprineti antimikrobnom delovanju leka. Opisana smanjena aktivnost ceftriaksona u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  i protiv *E. coli* i *S. aureus* je u skladu sa literaturnim podacima (Ali, 2011). U slučaju ceftazidima, antimikrobna aktivnost nije značajnije promenjena. U skladu sa rezultatima o degradaciji meropenema u prisustvu jona  $\text{Cu}^{2+}$  je i dobijena smanjena antibakterijska aktivnost sistema  $\text{Cu}^{2+}$ -meropenem.

#### D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **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  $\beta$ -lactam antibiotics with  $\text{Cu}^{2+}$  in physiological settings and the impact on antibacterial activity. *Free Radic Biol Med.* 2018;129:279-285. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.038. IF – 6.326, M21.
2. **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. doi: 10.1016/j.cbi.2017.10.022. IF - 3.180, M21.

## E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „*In vitro* interakcije jona bakra sa bilirubinom i  $\beta$ -laktamskim antibioticima“ Bojane Božić Cvijan predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizma interakcija jona bakra sa BR i  $\beta$ -laktamskim antibioticima. Pokazano je da BR redukuje  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^{1+}$  u odnosu 1:1 a da se  $\text{Cu}^{1+}$  odmah potom oksiduje pomoću kiseonika i generiše nastanak vodonik peroksida i hidroksil radikala koji mogu biti odgovorni za toksične efekte hiperbilirubinemije. Vezivanje  $\text{Cu}^{2+}$  za neorganske fosfate, fosfatnu grupu lipozoma ili penicilamin smanjuje redoks interakcije sa BR. Objašnjeni mehanizmi toksičnosti hiperbilirubinemije upućuju na značaj budućih istraživanja o primeni helatora bakra u slučajevima neonatalne hiperbilirubinemije. Penicilin G ne stupa u interakcije sa  $\text{Cu}^{2+}$ . Amoksisicilin, ampicilin i cefaleksin sa  $\text{Cu}^{2+}$  formiraju stabilne, obojene komplekse oktaedraelne koordinacije i tetragonalne distorzije, preko primarne amino grupe bočnog lanca. Tri pomenuta antibiotika povećavaju rastvorljivost  $\text{Cu}^{2+}$  u fosfatnom puferu. Ceftazidim i  $\text{Cu}^{2+}$  formiraju kompleks slične geometrije pri čemu se stvara organski radikal, dok je kompleks ceftriakson-  $\text{Cu}^{2+}$  drugačije geometrije. Svi kompleksi su u 1:1 stehiometrijskom odnosu. Cefaklor redukuje  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^{1+}$  koji potom reaguje sa kiseonikom pri čemu se stvara vodonik peroksid. U prisustvu jona bakra meropenem se razgrađuje. S obzirom na smanjenje antimikrobne aktivnosti ampicilina, amoksisicilina, ceftriaksona i meropenema u prisustvu jona bakra, neophodan je oprez prilikom njihove primene u uslovima koje karakteriše povišenje koncentracije bakra.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Bojane Božić Cvijan i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 02.07.2019.

Članovi Komisije:

Prof. dr Zoran Todorović

---

Prof. dr Ivana Ćirković

---

Doc. dr Dragana Protić

---

Doc. dr Janko Samardžić

---

Prof. dr Edvard Petri

---

Mentor:

Prof. dr Milica Bajčetić

---

Komentor:

N. sav. dr Ivan Spasojević

---