

Универзитет у Београду - Хемијски факултет Наставно - научном већу Хемијског факултета

Предмет: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Јелене М. Пољаревић, асистента Хемијског факултета, Универзитета у Београду.

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 11. јула 2013. године смо одређени за чланове комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Јелене М. Пољаревић, асистента Хемијског факултета, Универзитета у Београду, под насловом:

„Комплекси Pt(IV) и Pt(II) са новим диаминским лигандима: синтеза, карактеризација и антитуморска активност“

Након што смо поднели дисертацију прегледали, подносимо Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Јелене М. Пољаревић под наведеним насловом написана је на 122 стране А4 формата (проред 1,5), садржи 112 слика (од тога 82 у Прилогу), 15 табела и 14 шема. Рад обухвата следећа поглавља: 1. Увод (2 стране), 2. Општи део (23 стране), 3. Експериментални део (19 страна), 4. Резултати и дискусија (23 стране), 5. Закључак (2 стране), 6. Литература (7 страна, 84 цитата) и 7. Прилог (45 стране). Поред наведеног, докторска дисертација садржи: Захвалницу (1 страна), Садржај (2 стране), Извод на српском и енглеском језику (по две стране), Листу скраћеница (3 стране) и Биографију кандидата са листом радова и саопштења.

У **Уводу** је описана улога комплексних једињења у области бионеорганске и медицинске хемије. С обзиром на изванредну активност цисплатина, јасно је да он представља основу за синтезу многобројних комплекса платине (али и других метала) који би требало да надмаше његово дејство као антитуморског агенса. Напоменуто је да постоји низ физичких и хемијских својстава о којима треба водити рачуна у току синтезе ових комплекса. Осим избора централног металног јона веома је важан и избор лиганда. За платинске комплексе показало се да су најбољи избор диамински лиганди. Тако је и циљ ове докторске дисертације био да се синтетишу и окарактеришу нови диамински лиганди и њихови одоварајући комплекси платине(II) и платине(IV), али и испитају њихова антитуморска својства.

У **Општем делу** описан је цисплатин, механизам његовог дејства у ћелији и његови недостаци у току терапије овим леком. Даље су описана структурна својства која би

требало да има потенцијални цитостатик, на основу којих је и синтетисан велики број структурних аналога цисплатина. Детаљно је објашњен утицај разноврсних лиганата у платинским комплексима, на њихово антитуморско дејство, у зависности од типа и положаја лиганата у овим комплексима. Указано је на то да липофилнији комплекси платине имају веће шансе да буду изванредни антитуморски агенси. Такође је напоменуто да се очекује да комплекси платине(IV) имају боље антитуморско дејство од комплекса платине(II), због веће стабилности и мање реактивности у ћелији, тј. мањег броја споредних реакција. С тим у вези, укратко су описана три аналога цисплатина која су постигла највећи успех у медицинским истраживањима: карбоплатин, оксалиплатин и сатраплатин.

С обзиром на велики позитиван утицај диаминских лиганата на побољшање *in vitro* антитуморског дејства комплекса платине описани су, данас најчешће коришћени диамински лиганди, лиганди едда-типа и њихови одговарајући комплекси платине(II) и платине(IV). Описана је њихова структура и структурне карактеристике њима одговарајућих комплекса платине(II) и платине(IV), као и утицај структуре на антитуморско дејство ових комплекса. У овом делу описан је и начин синтезе комплекса платине(II) и платине(IV), као и утицај геометрије и типа диаминских и халогенидо лиганата на антитуморску активност ових комплекса. Укратко је дат историјски приказ синтезе могућих геометријских изомера комплекса платине(IV) са лигандима едда-типа дикарбоксилних киселина, што је био подстицај да се помоћу ММ и ДФТ предвиде фаворизовани геометријски изомери комплекса платине(IV) синтетисаних у току израде ове докторске дисертације.

У наставку текста описани су и механизми ћелијске смрти, апоптоза и некроза. Указано је на начине препознавања ових типова ћелијске смрти и значај апоптозе у односу на некрозу. На основу ових података, закључује се да би и за свако новосинтетисано једињење, које показује добру антитуморску активност, требало испитати на тип ћелијске смрти који изазива.

Поглавље **Експериментални део** јасно и прегледно описује синтезу нових диаминских лиганата (укупно 7) и одговарајућих платина(II) (укупно 5) и платина(IV) (укупно 6) комплекса. Подаци у вези са карактеризацијом синтетисаних једињења (тачка топљења, елементални састав, померања у НМР спектрима, апсорпција у инфрацрвени спектрима и пикови у масеним спектрима) јасно и прегледно су написани. У наставку текста наведене су хемикалије и прибор који су коришћени у синтезама ових једињења, као и карактеристике инструмената на којима су ова једињења структурно окарактерисана. Даље, наведене су ћелијске линије, поступци и методе коришћене за ипитување биолошке активности.

Поглавље **Резултати и дискусија** садржи преглед резултата истраживачког рада кандидата. У овом поглављу детаљно су описане синтезе свих синтетисаних једињења и дат шематски приказ сваке од њих. У посебним одељцима прокоментарисани су резултати добијени на основу стандардних спектроскопских метода. Поред ових метода, кандидат је за карактеризацију појединих једињења користио и савремену дводименционалну НМР методу (^1H , ^{13}C) HSQC). У циљу што прецизнијег потврђивања фаворизованих геометријских изомера комплекса платине(IV), урађени су ДФТ и ММ прорачуни. На основу резултата коришћених спектроскопских метода, дата је слика

претпостављених структура лиганда и комплекса. У наставку поглавља представљени су резултати до којих је кандидат дошао испитујући антитуморску активност синтетисаних једињења. Израчунате су IC_{50} вредности за комплексе платине(IV) и платине(II) и продискутоване у складу са литературним подацима, који се односе на структурно слична једињења. Сем тога, наведени су и резултати добијени на основу испитивања механизма ћелијске смрти ћелија третираних комплексима платине(IV). У наставку овог поглавља представљени су резултати испитивања утицаја синтетисаних комплекса платине(IV), на примеру једног одабраног комплекса, на ћелије имунског система и њихову функцију.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У оквиру овог рада синтетисано је седам нових лиганда етилендиаминског типа и њима одговарајући комплекси платине(II) и платине(IV). Синтетисани су (*S,S*)-етилендиамин- *N,N'*-2-амино-(3-циклохексил)пропанска киселина дихидрохлорид и њених четири одговарајућих *n*-алкил естера (метил, етил пропил и бутил) и два разграната естра (изобутил и изопентил), као и платина(IV) комплекси са свим лигандима осим естера разгранатих алкохола, и платина(II) комплекси са метил, етил и *n*-пропил естрима поменуте киселине. Полазна киселина добијена је у реакцији неесенцијалне аминокиселине *S*-2-амино-3-циклохексилпропанске киселине, претходно неутралисане раствором натријум-хидроксида, и 1,2-диброметана. Естри ове киселине добијени су стандардном методом естерификације са одговарајућим алкохолом у присуству тионил-хлорида. Комплекси платине(IV) добијени су у реакцији калијум-хексахлоридоплатината(IV) и одговарајућег дехидрохлорованог лиганда, у молском односу 1:1, у воденом раствору на 70 °C. Комплекси платине(II) добијени су у реакцији калијум-тетрахалогенидоплатината(II) (хлоридо-, јодидо-) и дехидрохлорованог лиганда у молском односу 1:1 и раствору вода-метанол (1:1), на собној температури.

За карактеризацију синтетисаних једињења коришћене су стандардне спектроскопске методе: НМР, инфрацрвена спектроскопија и масена спектрометрија, док је њихов састав потврђен елементалном анализом. Урађени су ДФТ и ММ прорачуни, како би се потврдили највероватнији геометријски изомери платина(IV) комплекса. За сва комплексна једињења испитан је антитуморски ефекат на панелу ћелијских линија. У ове сврхе коришћени су стандардни тестови вијабилитета (МТТ, кристал-виолет, ЛДХ и одређивање активности ендogene киселе фосфатазе) након истека 24 сата третмана. Затим су израчунате IC_{50} вредности, односно концентрације испитиваних једињења које доводе до смрти половине броја живих ћелија. На овај начин утврђено је да су лиганд **L3**, комплекс **K3** (међу комплексима платине(IV)) и **K3a**, **K3b** (међу комплексима платине(II)) показали најснажније цитотоксично дејство, упоредиво или снажније од цисплатина. Анализа резултата теста киселе фосфатазе показала је да су комплекси платине(II), **K3a** и **K3b** ефикаснији у односу на одговарајући комплекс платине(IV), **K3**, према ћелијској линији хумане промијелоцитне леукемије, HL-60.

Новосинтетисан комплекс **K3**, искоришћен је за анализу параметара ћелијске смрти и стварања реактивних кисеоничних врста на ћелијској линији хуманог глиома - U251.

Утврђено је да комплекс индукује ћелијску смрт најсличнију некрози. На примеру комплекса **K4**, испитано је да ли ова серија комплекса платине(IV) има имуносупресивно дејство на функцију ћелија имунског система. Потврђено је да нема негативног утицаја ових комплекса на функције ћелија имунског система, што је од значаја с обзиром да се применом цисплатина као споредни ефекат може испољити мијелосупресија и леукопенија.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Након открића изузетног антитуморског дејства цисплатина, комплекси метала, а посебно платине привлаче пажњу истраживача. Деценијама уназад развијају се синтетичке методе у циљу проналажења још бољег и ефикаснијег хемиотерапеутика од цисплатина. У те сврхе синтетишу се многобројни и разноврсни комплекси метала. Значајно је напоменути и да постоји велики број органских молекула, који сами по себи имају изражено антитуморско дејство. Последњих година велику пажњу привлаче молекули етилендиаминског типа и њихови комплекси платине(II) и платине(IV). Комплекси платине(II) синтетишу се као аналози цисплатина, а комплекси платине(IV) због очекивано веће инертности и стабилности у ћелији. Литературни подаци указују да су последњих година и неки комплекси платине(II) са диаминским и јодидо лигандима показали добру антитуморску активност.

У раду су детаљно описане синтезе седам нових диаминских лиганата и њихових одговарајућих шест комплекса платине(IV) и пет комплекса платине(II). Новосинтетисана једињења потпуно су окарактерисана стандардним спектроскопским методама карактеризације. ММ и ДФТ прорачунима претпостављени су фаворизовани геометријски изомери комплекса платине(IV). Ови подаци су у сагласности са хемијским померањима у НМР и инфрацрвеним спектрима. Добијени резултати о структури и геометрији синтетисаних комплекса платине(IV) и платине(II) у потпуности се слажу са литературним подацима о до сада синтетисаним аналогним једињењима. Поједини комплекси и лиганди показали су бољу цитотоксичну активност према свим испитиваним ћелијским линијама од цисплатине. Утврђено је да је највероватнији тип ћелијске смрти некроза. Истакнуто је и да комплекси платине(IV) немају негативан утицај на ћелије имунског система, што је такође предност ових комплекса у односу на цисплатин.

Г. Објављени и саопштени радови који чине део дисертације

Радови у врхунским међународним часописима M₂₁

1. **J.M. Lazić**, Lj. Vučićević, S. Grgurić-Šipka, K. Janjetović, G.N. Kaludjerović, M. Misirkić, M. Gruden-Pavlović, D. Popadić, R. Paschke, V. Trajković, T.J. Sabo, Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-*N,N'*-diacetate-type ligands. ChemMedChem., 2010, 5, 881-889.

2. Đ. Miljković, **J.M. Poljarević**, F. Petković, J. Blaževski, M. Momčilović, I. Nikolić, T. Saksida, S. Stošić-Grujičić, S. Grgurić-Šipka, T.J. Sabo, Novel octahedral Pt(IV) complex with di-*n*-propyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoato ligand exerts potent immunomodulatory effects, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 47, 194-201.

Рад у међународном часопису M₂₃

1. **J.M. Poljarević**, S. Grgurić-Šipka, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Dibromido[(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoato]platinum(IV). Synthesis, characterization, and DFT calculations, *J. Coord. Chem.*, 2011, 64(6), 1016-1022.

Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M₃₄)

1. S. Misirlić-Denčić, **J. Lazić**, A.J. Isaković, T. Živanović-Radnić, M. Dulović, V. Bumbaširević, V. Trajković, A.M. Isaković, T. Sabo, I. Marković, Antileukemic action of novel cyclohexyl analogue of ethylenediamine dipropanoic acid, Eight international conference on mechanisms of cell death and disease: advances in therapeutic intervention and drug development, 14-17 october, 2010, Cascais, Portugal
2. **J.M. Lazić**, S. Grgurić-Šipka, Lj. Vučićević, V. Trajković, T.J. Sabo, Platinum(IV) complexes with cyclohexyl functionalized edda-type ligands as potential cytotoxic agents, PO-91, Eurobic10, 2010, Thessaloniki, Greece.

Д. Закључак

У приложеној докторској дисертацији под насловом „Комплекси Pt(IV) и Pt(II) са новим диаминским лигандима: синтеза, карактеризација и антитуморска активност“ Јелена М. Пољаревић, дипломирани хемичар, успешно је одговорила на све постављене задатке који се односе на синтезу и карактеризацију седам нових диаминских лиганада и одговарајућих платина(IV) комплекса (укупно шест) и платина(II) комплекса (укупно пет). Испитано је и упоређено цитотоксично дејство синтетисаних лиганада и комплекса. Утврђено је да и лиганди и комплекси показују значајну антитуморску активност и то доста бољу од цисплатина, тренутно најефикаснијег хемиотерапеутика.

Научно-истраживачки рад кандидата је публикован у оквиру 3 научна рада, која су директно проистекла из докторске дисертације (два рада категорије M₂₁ и један рад категорије M₂₃). Додатно су резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације саопштени на два научна скупа од међународног значаја. Комисија је мишљења да резултати објављени у поднетој докторској дисертацији представљају значајан допринос у области платинских комплексних једињења. Поред тога, Комисија сматра да се истраживања у спроведена у оквиру ове дисертације уклапају у савремене трендове опште и неорганске, односно бинеорганске и координационе хемије.

У складу с тим предлажемо Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да поднету докторску дисертацију Јелене М. Пољаревић прихвати и одобри њену одбрану.

Комисија референата:

др Тибор Сабо
редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ментор

др Сања Гргурић-Шипка
ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ментор

др Софија Совиљ
редовни професор у пензији Хемијског факултета Универзитета у Београду

др Срећко Трифуновић
редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу

др Иванка Марковић
ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду

У Београду, 09.04.2015.