

**Универзитет у Београду – Хемијски факултет**

**Наставно – научном већу Хемијског факултета**

**Предмет:** Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Небојше Ђ. Пантелића, асистента на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду.

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 15. јануара 2015. године одређени смо за чланове комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Небојше Ђ. Пантелића, асистента на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, под насловом:

**„Синтеза, карактеризација и цитотоксичност комплекса  
злата(III) са естрима R<sub>2</sub>edda-типа“**

Након што смо поднели дисертацију прегледали, подносимо Већу следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**А. Приказ садржаја дисертације**

Докторска дисертација Небојше Ђ. Пантелића под наведеним насловом написана је на 145 страна А4 формата (проред 1,5), садржи 109 слика (од тога 67 у Прилогу), 14 табела и 8 шема. Рад обухвата следећа поглавља: 1. Увод (1 страна), 2. Општи део (33 стране), 3. Експериментални део (18 страна), 4. Резултати и дискусија (36 страна), 5. Закључак (3 стране), 6. Литература (10 страна, 168 цитата) и Прилог (37 страна). Поред наведеног, докторска дисертација садржи: Захвалницу (1 страна), Садржај (4 стране), Извод на српском и енглеском језику (по 3 стране), Листа скраћеница (2 стране) и Биографију кандидата (1 страна) са листом радова и саопштења.

У **Уводу** је у кратким цртама описан значај комплексних једињења злата у различитим областима истраживања. С обзиром да велики број комплекса злата испољава антитуморско дејство, јасно је да се њихов највећи допринос огледа на пољу бионеорганске и медицинске хемије. Поред тога, естри R<sub>2</sub>edda-типа су интересантни као лиганди због различитих могућности координације за јоне метала. Како до сада нису

описана комплексна једињења злата(III) са *NN* бидентатним R<sub>2</sub>edda-типом лигананда, циљ ове дисертације је синтеза и карактеризација комплекса злата(III) са овим типом лигананда, утврђивање њихове изомерије, оксидо-редукционих особина, *in vitro* антитуморске активности, као и механизма уништавања туморских ћелија.

У **Општем делу** описана је биолошка активност и механизам деловања цисплатине и њена примена у терапији разних врста тумора. Имајући у виду способност *NN* бидентатних лигананда да се координују за централни метални јон, извршена је класификација лигананда који припадају R<sub>2</sub>edda групи. Такође, шематски су приказани поступци за добијање истих. У наставку текста описани су комплекси платине(II/IV) са лигандима R<sub>2</sub>edda типа, њихова изомерија и биолошка активност на различитим туморским ћелијама. Посебно значајан део овог поглавља обухватају физичка и хемијска својства злата и његове карактеристике као централног металног јона у комплексним једињењима. У том смислу, поменути су и комплекси злата(I) као антитуморски агенси. Такође, описана су многобројна истраживања комплекса злата(III), синтезе, карактеризације и њихова интеракција са биолошки важним молекулима као што су аминокиселине, пептиди и протеини, као и антитуморска активност на разним туморским ћелијама. У најновијим истраживањима објашњен је механизам деловања комплекса злата(III) који обухвата интеракције ових једињења са селеноензим тиоредоксин редуктазом, која је одговорна за цитотоксичност комплекса злата. *In vivo* истраживања комплексних једињења злата испољила су цитотоксичност на туморским ћелијама, што указује на могућност да се комплекси злата(III) могу применити у терапији лечења тумора. На крају овог поглавља истакнута је примена комплекса злата у терапији неких обољења као што су реуматоидни артритис, ХИВ и различите паразитске болести.

Поглавље **Експериментални део** обухвата детаљно написане синтезе, услове рада као и све хемикалије и реагенсе коришћене за синтезу и карактеризацију новосинтетисаних једињења. Јасно и прегледно је описана синтеза новог диаминског лигананда као и 15 нових злато(III) комплекса са лигандима R<sub>2</sub>edda-типа. Подаци у вези са карактеризацијом синтетисаних једињења (елементална анализа, UV/Vis, IC и NMR спектроскопија, масена спектрометрија, полариметрија, електрохемијска мерења и DFT прорачуни) су такође прегледно наведени. На крају овог поглавља наведене су ћелијске линије, поступци и методе за испитивање цитотоксичне активности и механизма њиховог деловања.

Поглавље **Резултати и дискусија** садржи преглед резултата истраживачког рада кандидата. Презентована су сва синтетисана једињења, лиганд и злато(III) комплекси. Свака метода карактеризације је појединачно продискутована на основу добијених спектроскопских података и на овај начин је кандидат потврдио претпостављену структуру и састав синтетисаних једињења. Затим, поглавље обухвата резултате испитивања оксидо-редукционих својстава појединих синтетисаних комплекса. Приказани су циклични волтамограми значајни за описивање електрохемијског понашања

испитиваних комплекса. Такође, рађени су DFT прорачуни свих синтетисаних комплекса како би се истражила селективност настајања изомера. Из сваке серије комплекса презентована је израчуната структура комплекса. У наставку поглавља представљени су резултати који се односе на испитивање антипролиферативне активности свих синтетисаних комплекса, а добијене IC<sub>50</sub> вредности, као и селективност, про diskutовани су у складу са подацима из литературе који се односе на структурно слична једињења. Други део биолошких испитивања односи се на проучавање механизма ћелијске смрти. У оквиру овог дела приказане су слике са флуоресцентних микроскопа АО-ЕБ обојених HeLa туморских ћелија као и дистрибуција ћелијског циклуса на HeLa ћелијама након деловања испитиваних комплекса. На крају овог поглавља истакнути су резултати испитивања стабилности изабраног комплекса при физиолошким условима, понашање изабраног комплекса у присуству природног редуцента (аскорбинска киселина) као и интеракција изабраног комплекса са протеином (говеђи серум албумин).

У поглављу **Закључак** су прегледно сумирани резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације.

Део **Литература** обухвата радове из области истраживања од интереса за ову докторску дисертацију (укупно 168 цитата).

У **Прилогу** су представљени инфрацрвени, нуклеарно-магнетно резонанциони и масени спектри (укупно 67 слика) на основу којих су синтетисана једињења окарактерисана.

## **Б. Кратак опис постигнутих резултата**

У оквиру овог рада синтетисан је нови диизоамил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропанске киселине. Овај лиганд прекурсор је добијен рефлуктовањем суспензије киселине и апсолутног изоамил алкохола коме је претходно укапан тионил-хлорид. Комплекси злата(III) добијени су у реакцији полазног комплекса, Na[AuCl<sub>4</sub>]·2H<sub>2</sub>O, са *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропаноатом (бутил, пентил, изобутил, изоамил и циклопентил естри) или *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)пентаноатом (пропил, бутил, пентил и изобутил естри) или *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил)пропаноатом (метил, етил, пропил, бутил, изобутил и изоамил естри) у метанолу и литијум-хидроксида у молском односу 1:1:2 у мраку на собној температури, а након додавања чврстог амонијум-хексафлуорофосфата.

За карактеризацију синтетисаних једињења коришћене су стандардне методе: UV/Vis, IC, NMR спектроскопија и масена спектрометрија, док је њихов састав одређен

елементалном анализом. Детаљна анализа спектроскопских података упућује на бидентатну координацију лигананда преко азотових атома за централни метални јон.

Оксидо-редукциона својства свих синтетисаних комплекса из серије  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$  и  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$  испитана су методама цикличне и диференцијално пулсне волтаметрије. Утврђено је да се редукција злато(III) комплекса врши до злато(I) врсте у виду два иреверзибилна електронска корака праћена губитком хлоридо лигананда. Појава редукционог корака  $\text{Au}^{\text{III}}/\text{Au}^0$  се искључује због изостанка елементалног злата на платинској електроди што је потврђено након редукције при константном потенцијалу од  $-0,8 \text{ V}$  (*vs.*  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) у трајању од 15 минута.

Антипролиферативна активност синтетисаних комплекса одређена је према туморским ћелијама: хуманог аденокарцинома материце (HeLa), хуманог малигног меланома (Fem-x), хумане мијелоидне леукемије (K562) као и на здравим хуманим нестимулисаним (PBMC) и стимулисаним мононуклеарним ћелијама (PBMC + PHA), изолованим из периферне крви и/или ћелијама феталног плућног фибробласта (MRC-5). Сви комплекси из серије  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$  показују високу цитотоксичну активност према свим испитиваним ћелијским линијама, а највећу према Fem-x ћелијама. Најнижу  $\text{IC}_{50}$  вредност према Fem-x ћелијама показује комплекс  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iAm}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ , али истовремено и најнижу према HeLa и K562 ћелијским линијама. Индекс селективности ових комплекса показује да су мање токсични и знатно селективнији од цисплатине. Посебно треба истаћи да је комплекс  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iAm}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$  4 пута активнији и има 28 пута бољу селективност у односу на цисплатину. Комплекси из серије  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}}]\text{PF}_6$  показују највећу активност према K562 ћелијама која је упоредива са референтном супстанцом, цисплатином. Из серије  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$ , најактивнији је комплекс када је  $\text{R} = \text{iAm}$  према K562 ћелијама који је активнији и од цисплатине, али је умерено активан према HeLa ћелијској линији. Овај комплекс је уједно и најселективнији. Такође, утврђено је да испитивани комплекси индукују апоптозу.

Испитивање стабилности комплекса  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$  у DMSO-у и физиолошком медијуму (PBS, pH 7,4) праћено је помоћу UV/Vis и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопије. Испитивани комплекс је стабилан у DMSO-у током 24-часовног праћења UV/Vis спектроскопијом. Снимљени  $^{13}\text{C}$  NMR спектри комплекса у PBS-у током времена (0, 2, 24 и 48 h) показују координационе промене у комплексу тако да вероватно долази до супституције хлоридо лигананда молекулима воде при чему настају  $[\text{AuCl}(\text{H}_2\text{O})\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]^{2+}$  или  $[\text{Au}(\text{H}_2\text{O})_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]^{3+}$ .

У циљу испитивања могућности да се комплекси злата(III) редукују у ћелији са биолошки релевантним редуцентом, праћена је реакција комплекса  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$  са аскорбинском киселином, снимањем  $^{13}\text{C}$  NMR спектра.

Испитивања су показала да аскорбинска киселина тренутно редукује комплекс, што указује на високу могућност истог исхода у живим ћелијама.

Такође, праћена је интеракција комплекса  $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddp}\}]\text{PF}_6$  са говеђим серум албумином (BSA) помоћу UV/Vis спектроскопије. Претпоставља се да се комплекс злата(III) редукује цистеином из албумина до злато(I) врсте, што се може видети на спектрима након 2 сата реакције. Након 24 и 48 h, UV/Vis спектри указују да долази до диспропорционисања злата(I) до одговарајућих злато(III) једињења и елементарног злата.

## **В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе**

Досадашња изучавања у области антитуморске активности комплексних једињења елементарних прелазних метала и њихова примена у медицини започела је након открића цитотоксичности квадратно-планарног комплекса платине, цисплатине. Након примене цисплатине у лечењу тумора синтетисан је велики број комплекса прелазних метала у циљу проналажења бољег цитостатика. Комплекси злата(III) имају дугу традицију примене у медицини. Злато(III) комплекси су изоструктурни и изоелектронски платина(II) комплексима па представљају потенцијалне антитуморске агенсе. Услед примене комплекса злата(III) у лечењу тумора, у току последњих неколико деценија интензивно су изучаване реакције злато(III) јона са биолошки важним лигандима као што су аминокиселине, пептиди, протеини и ДНК. Механизам антитуморског деловања комплекса злата(III) још увек није у потпуности разјашњен и представља предмет проучавања.

У раду су детаљно описане синтезе новог диаминског лиганда као и 15 комплекса злата(III) са лигандима  $R_2\text{edda}$ -типа. Новосинтетисана једињења су потпуно окарактерисана стандардним методама карактеризације. Да би се боље разумео механизам деловања комплекса злата(III) као антитуморских агенаса, урађено је електрохемијско испитивање комплекса методом цикличне и диференцијално пулсне волтаметрије. Подаци из литературе упућују на то да би за скоро све познате комплексе злата(III) активни метаболити могле бити одговарајуће злато(I) врсте, добијене редукцијом злато(III) комплекса *in vivo*. Стога, вредности редукционих потенцијала су незаобилазни параметар за утврђивање начина деловања злато(III) комплекса јер се већина металофармацеутских лекова активира *in vivo* као резултат електронског трансфера. Такође, поједини синтетисани комплекси злата(III) показују знатно бољу цитотоксичност и селективност од цисплатине према одабраним ћелијским линијама.

## Г. Објављени и саопштени радови који су део дисертације

### Радови у врхунским међународним часописима (M21)

1. **N. Pantelić**, T. Stanojković, B.B. Zmejkovski, T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, *In vitro* activity of gold(III) complexes with some esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid, *Eur. J. Med. Chem.* 90 (2015) 766–774.
2. **N. Pantelić**, B.B. Zmejkovski, J. Trifunović-Macedoljan, A. Savić, D. Stanković, A. Damjanović, Z. Juranić, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Gold(III) complexes with esters of cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-*N,N'*-diacetate, *J. Inorg. Biochem.* 128 (2013) 146–153.

### Рад у међународном часопису (M23)

1. **N. Pantelić**, B.B. Zmejkovski, T.P. Stanojković, V.V. Jeftić, G.P. Radić, S.R. Trifunović, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Synthesis and high *in-vitro* cytotoxicity of some (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride esters, *J. Serb. Chem. Soc.*, 79 (2014) 649–658.

### Rad proistekao iz doktorske disertacije u procesu recenzije:

1. **N. Pantelić**, D. Stanković, B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Electrochemical properties of some gold(III) complexes with (*S,S*)-R<sub>2</sub>edda-type ligands.

### Радови саопштени на скуповима националног значаја:

1. **N. Pantelić**, B.B. Zmejkovski, A. Kostić, G.N. Kaluđerović, T. Sabo, Synthesis and characterization of a gold(III) complex with isoamyl ester of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propionic acid. 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries; June 27-29, Belgrade, Serbia, 2013. Program i zbornik radova, BS-Cy P03.
2. J. Trifunović-Macedoljan, **N. Pantelić**, A. Damjanović, B. Kolundžija, I. Matić, M. Đorđić, S. Grgurić-Šipka, T. Sabo, Z. Juranić, Anticancer activity of newly synthesized Au(III) complexes. 49. Kancerološka nedelja, 29. novembar-1. decembar, Beograd, 2012. Program i zbornik radova, P9.

3. **N. Pantelić**, Sythesis and characterization of a gold(III) complex with R<sub>2</sub>edda type ligand, Prva konferencija mladih hemičara, 19-20. Oktobar, Beograd, 2012. Program i zbornik radova, P11.

#### Д. Закључак

У приложеној докторској дисертацији под називом „СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ЦИТОТОКСИЧНОСТ КОМПЛЕКСА ЗЛАТА(III) СА ЕСТРИМА R<sub>2</sub>edda-ТИПА“ Небојша Ђ. Пантелић, дипломирани хемичар, успешно је одговорио на све постављене задатке који се односе на синтезу и карактеризацију једног новог диаминског лиганда и комплекса злата(III) са лигандима R<sub>2</sub>edda-типа (укупно 15). Део ове дисертације је обухватио испитивање електрохемијских особина појединих синтетисаних комплекса, антитуморске активности свих синтетисаних комплекса, механизма изумирања хелија, затим стабилност изабраног комплекса при физиолошким условима, понашање изабраног комплекса у присуству природног редуцента (аскорбинска киселина) као и интеракција изабраног комплекса са протеином (говеђи серум албумин). Посебно треба истаћи да један од синтетисаних комплекса показује 4 пута већу активност и 28 пута бољу селективност у односу на цисплатину. Научно-истраживачки рад кандидата је публикован у оквиру 3 научна рада која су директно проистекла из докторске дисертације (2 рада из категорије M21 и један из категорије M23), док је рецензија једног рада у току. Додатно су резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације саопштени на три научна скупа од националног значаја. Комисија је мишљења да резултати објављени у поднетој докторској дисертацији представљају значајан допринос у области комплексних једињења злата. Поред тога, Комисија сматра да се истраживања спроведена у оквиру ове дисертације уклапају у савремене трендове Опште и неорганске, односно Бионеорганске и Координационе хемије.

У складу са тим предлажемо Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да поднету докторску дисертацију Небојше Ћ. Пантелића прихвати и одобри њену одбрану.

### Комисија

---

др Тибор Сабо, редовни професор  
Хемијски факултет Универзитета у Београду

---

др Бојана Змејковски, научни сарадник  
Центар за хемију, Институт за хемију, технологију и металургију,  
Универзитет у Београду

---

др Горан Калуђеровић, privat dozent  
Leibniz-Institute of Plant Biochemistry,  
Department of Bioorganic Chemistry, Halle (Saale), Germany

---

др Маја Груден-Павловић, ванредни професор  
Хемијски факултет Универзитета у Београду

---

др Татјана Станојковић, научни сарадник  
Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд

---

др Евица Ивановић, ванредни професор  
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду

У Београду, \_\_\_\_\_ 2015. год