

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet
Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta

Predmet: Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije mr Gordane M. Rakić,
profesora biologije i hemije

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 4. juna 2012. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije mr Gordane M. Rakić, profesora biologije i hemije, pod naslovom:

„Sinteza, karakterizacija i antitumorska aktivnost *trans*-kompleksa Pt(II) i Pt(IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima”

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo Veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija **mr Gordana M. Rakić** pod navedenim naslovom napisana je na 147 strana formata A4 (prored 1,5), sadrži 104 slike (od toga 59 u Prilogu) i 17 tabela. Rad obuhvata sledeća poglavlja: 1. Uvod (2 strane), 2. Opšti deo (39 strana), 3. Eksperimentalni deo (25 strana), 4. Rezultati i diskusija (28 strana), 5. Zaključak (4 strane), 6. Literatura (9 strana, 157 citata), 7. Prilog (33 strane). Pored navedenog doktorska disertacija sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku (po 2 strane), Sadržaj (2 strane), Zahvalnicu (1 strana), Listu skraćenica (3 strane) i Biografiju kandidata sa listom radova i saopštenja.

U **Uvodu** je predstavljen predmet istraživanja rada. Uz kratak osvrt na važnost kompleksnih jedinjenja u koordinacionoj i bioneorganskoj hemiji, posebno je istaknut značaj

antikancerogenih lekova baziranih na platini koji imaju veliku primenu u lečenju različitih humanih kancera. Istaknuto je da postoji niz fizičkih i hemijskih svojstava o kojima treba voditi računa u toku sinteze. Takođe je napomenuto da *trans*-kompleksi mogu imati i značajno bolju biološku aktivnost od *cis*-analoga. Kao osnovni cilj ove doktorske disertacije istaknuta je sinteza novih *trans*-kompleksa platine(II) i platine(IV) sa piridinskim derivatima (acetil- i dikarboksilato-) kao ligandima i ispitivanje njihove *in vitro* antitumorske aktivnosti.

U okviru poglavlja **Opšti deo** ukratko je dat istorijat primene kompleksa platine u medicini, od cisplatine, preko kompleksa platine druge i treće generacije uključujući i komplekse platine(IV) koji se mogu oralno primenjivati. Istaknute su prednosti, ali i nedostaci do sada korišćenih jedinjenja, a sve u cilju dizajniranja i pronalaženja što efikasnijih hemioterapeutika. Dat je sažet pregled literature o sintetisanim kompleksima prelaznih metala sa piridinskim derivatima kao ligandima, posebno sa ligandnim sistemima koji su korišćeni za sintezu kompleksa u ovoj doktorskoj disertaciji. Predstavljene su strukture pomenutih kompleksa prelaznih metala, sa osvrtom na način koordinacije liganada i istaknute su njihove biološke osobine.

U poglavlju **Eksperimentalni deo** dati su detaljni opisi sinteza polaznih kompleksa platine i novih kompleksnih jedinjenja platine(II) i platine(IV). Sve reakcije su prikazane reakcionim šemama. Takođe su predstavljene metode korišćene za određivanje sastava i strukture kompleksa: elementalna analiza, IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopija kao i rendgenska strukturalna analiza. U ovom poglavlju su navedene i hemikalije, reagensi, ćelijske linije, kao i postupci i metode korišćene u sintezi, karakterizaciji i ispitivanju *in vitro* antiproliferativne aktivnosti.

Poglavlje **Rezultatima i diskusija** sadrži pregled rezultata istraživačkog rada kandidata prikazan u sedam celina. Najpre je dat pregled novosintetisanih kompleksa platine(II) i platine(IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima. U posebnim odeljcima detaljno su prikazani i prokomentarisani rezultati dobijeni na osnovu standardnih spektroskopskih metoda (IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR). Zatim su protumačeni rezultati dobijeni rendgenskom strukturalnom analizom kompleksa na osnovu kojih su definitivno potvrđene strukture kompleksa 2, 4 i 7. Da bi se istražila selektivnost građenja najstabilnijeg geometrijskog izomera kompleksa rađeni su DFT proračuni, a rezultati dobijeni ovim proračunima u saglasnosti su sa NMR spektroskopskim podacima i podacima dobijenim rendgenskom strukturalnom analizom. I na kraju su prezentovani

rezultati antiproliferativne aktivnosti svih sintetisanih *trans*-kompleksa platine. Izračunate su IC_{50} vrednosti za komplekse i prodiskutovane u skladu sa literaturnim podacima za strukturno slična jedinjenja u odnosu na referentnu cisplatinu. Svi *trans*-acetilpiridinski kompleksi platine pokazali su značajnu antiproliferativnu aktivnost na celokupnom panelu tumorskih ćelija. Važno je istaći da su svi *trans*-acetilpiridinski kompleksi platine na humanoj endotelijalnoj liniji EA.hy 926 pokazali značajno bolju antiproliferativnu aktivnost od cisplatine. Pored toga acetilpiridinski kompleksi platine(IV) ispoljavaju i manju toksičnost na zdravoj liniji fetalnih humanih fibroblasta pluća MRC-5.

U poglavlju **Zaključak** kandidat je je sumirao i prokomentarisao rezultate dobijene u okviru doktorske disertacije.

Navedena **Literatura** obuhvata radove iz oblasti istraživanja (157 citata) i iscrpno pokriva sve delove disertacije.

U **Prilogu** su kroz 59 slika predstavljeni spektroskopski podaci, IC, 1H i ^{13}C NMR spektri koji su korišćeni za karakterizaciju sintetisanih jedinjenja i čiji su karakteristični signali prezentovani i diskutovani u okviru poglavlja Rezultati i diskusija.

B. Kratak opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana je sinteza, karakterizacija i antitumorska aktivnost šest kompleksa *trans*-platine(II) i pet kompleksa *trans*-platine(IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima. Sintetisani kompleksi dobijeni su reakcijom polaznih kompleksa platine, $K_2[PtCl_4]$ odnosno $K_2[PtCl_6]$, sa odgovarajućim ligandima u molskom odnosu 1 : 2 u vodi, uz blago zagrevanje. Za sintezu kompleksa korišćeni su komercijalno dostupni ligandi koji predstavljaju piridinske derivate sa acetil supstituentima (3- i 4-acetilpiridin) i sa dve karboksilne grupe (2,3-, 2,4-, 2,5- i 2,6-piridindikarboksilna kiselina).

Novosintetisani kompleksi okarakterisani su standardnim metodama karakterizacije: IC, 1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom, dok su pretpostavljene molekulske formule potvrđene elementalnom analizom. Strukture kompleksa platine(II) i platine(IV) sa 4-acetilpiridinom, kao i kompleksa platine(IV) sa 2,5-piridindikarboksilnom kiselinom potvrđene su rendgenskom strukturnom analizom, koja je pokazala da su svi kompleksi *trans*-geometrije. Acetilpiridinski derivati su monodentatno koordinovani za jone platine, a dikarboksilatni derivati piridina su

bidentatno koordinovani u monoanjonskom obliku. Kompleksi Pt(II) su kvadratno-planarne geometrije sa po dva koordinovana monodentatna ili bidentatna liganda u svakom. Kod acetilpiridinskih kompleksa Pt(II) preostala koordinaciona mesta u strukturama kompleksa zauzeta su hloridnim anjonima. Kompleksi Pt(IV) imaju iskrivljenu oktaedarsku geometriju i u njihovoj strukturi su takođe po dva koordinovana monodentatna ili bidentatna monoanjonska liganda, uz hloridne anjone koji upotpunjuju pomenutu geometriju kompleksa. Kod svih kompleksa hloridni anjoni su *trans*-orijentacije u odnosu na platinski metalni centar. DFT proračuni su dodatno potvrdili pretpostavljene energetske najpovoljnije i termodinamički najstabilnije *trans*-geometrije izomera kvadratno-planarnih platina(II) i oktaedarskih platina(IV) kompleksa.

Ispitana je antiproliferativna aktivnost svih sintetisanih kompleksa na panelu različitih ćelijskih linija, primenom odgovarajućeg testa vijabiliteta (SRB i MTT test). Za *trans*-acetilpiridinske komplekse platine dobijeni su značajni rezultati, dok preostali piridin-dikarboksilato kompleksi pokazuju umerenu antiproliferativnu aktivnost. Proučavanje biološke aktivnosti ukazalo je da kompleksi platine sa acetil supstituentima na piridinskom prstenu pokazuju višu *in vitro* antiproliferativnu aktivnost nego kompleksi sa karboksilato supstituentima na piridinu. Dobijena je značajna antiproliferativna aktivnost *trans*-dihloridobis(4-acetilpiridin)platina(II) kompleksa na cisplatina rezistentnoj subliniji humanog osteosarkoma U2OScisR, bolja nego za cisplatinu. Posebno se ističu *trans*-platina(II) i *trans*-platina(IV) kompleksi sa 3- i 4-acetilpiridinom koji su na humanoj endotelijalnoj liniji EA.hy 926 pokazali značajno bolju antiproliferativnu aktivnost od cisplatine. Takođe je važno naglasiti da *trans*-acetilpiridinski kompleksi platine(IV) ispoljavaju i manju toksičnost na zdravoj liniji fetalnih humanih fibroblasta pluća MRC-5.

C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Još od Rosenbergovog otkrića cisplatine 1965. god. radi se na dizajniranju i pronalaženju što efikasnijih hemioterapeutika. Možemo reći da centralno mesto zauzimaju kompleksi platine, mada su i drugi prelazni metali intenzivno proučavani. Treba napomenuti da je najpre bilo zastupljeno mišljenje da su *trans*-kompleksi manje aktivni ili čak neaktivni. Od ranih

devedesetih godina Farrell *et al.* su prvi pokazali da pojedini *trans*-kompleksi imaju značajno višu antiproliferativnu aktivnost u poređenju sa njihovim odgovarajućim *cis*-analogima.

U radu su opisani postupci sinteze šest kompleksa *trans*-platine(II) i pet kompleksa *trans*-platine(IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima. Kompleksi su detaljno okarakterisani elementalnom analizom, IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom. Strukture kompleksa dobijenih u pogodnom kristalnom obliku potvrđene su rendgenskom strukturnom analizom, koja je pokazala da su svi kompleksi *trans*-geometrije. DFT proračuni su u saglasnosti sa rezultatima ovih metoda i potvrdili su pretpostavljene najstabilnije *trans*-geometrije izomera kvadratno-planarnih platina(II) i oktaedarskih platina(IV) kompleksa.

U literaturi ne postoje kompleksi platine *trans*-geometrije sa ligandima koji su korišćeni u ovom radu. S obzirom na to da se radi o novosintetisanim jedinjenjima, njihova detaljna karakterizacija bila je preduslov za ispitivanje njihovog uticaja na preživljavanje tumorskih ćelijskih linija. Iako do sada nema preciznih podataka o korelaciji strukture i aktivnosti kompleksa, sa sigurnošću se može tvrditi da kombinacije različito supstituisanih monodentatnih i bidentatnih piridinskih liganda, ali i odlazećih grupa utiču na farmakološke osobine ovih jedinjenja. Naši rezultati pokazuju da su acetilpiridinski derivati, posebno sa supstituentom u *para*-položaju potencijalno bolji izbor u odnosu na dikarboksilatne derivate piridina. Dobijeni rezultati ističu potrebu daljeg istraživanja molekularnog mehanizma delovanja novosintetisanih kompleksa.

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskom časopisu međunarodnog značaja (M21)

1. Gordana M. Rakić, Sanja Grgurić-Šipka, Goran N. Kaluđerović, Santiago Gómez-Ruiz, Snežana K. Bjelogrić, Siniša S. Radulović, Živoslav Lj. Tešić, Novel *trans*-dichloridoplatinum(II) complexes with 3- and 4-acetylpyridine: Synthesis, characterization, DFT calculations and cytotoxicity, *Eur. J. Med. Chem.*, 44, **2009**, 1921-1925, ISSN 0223-5234, IF 3.269 (2009).

2. Gordana Rakić, Sanja Grgurić-Šipka, Goran N. Kaluđerović, Martin Bette, Lana Filipović, Sandra Arandelović, Siniša Radulović, Živoslav Lj. Tešić, The synthesis, spectroscopic, X-ray

characterization and *in vitro* cytotoxic testing results of activity of five new *trans*-platinum(IV) complexes with functionalized pyridines, *Eur. J. Med. Chem.*, 55, **2012**, 214-219, ISSN 0223-5234, IF 3.499 (2012).

Rad objavljen u časopisu međunarodnog značaja (M23)

3. Lana Filipović, Sandra Arandelović, Nevenka Gligorijević, Ana Krivokuća, Radmila Janković, Tatjana Srdić-Rajić, Gordana Rakić, Živoslav Tešić, Siniša Radulović, Biological evaluation of *trans*-dichloridoplatinum(II) complexes with 3- and 4-acetylpyridine in comparison to *cisplatin*, *Radiol. Oncol.*, **2013**, 1-12, ISSN 1318-2099, IF 1.667 (2013).

Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja, štampano u izvodu (M34):

1. Lana Filipović, Gordana Rakić, Sandra Arandelović, Nevenka Gligorijević, Ksenija Jakovljević, Radmila Janković, Biljana Dojčinović, Živoslav Tešić, Siniša Radulović. Cytotoxic and *in vitro* antimetastatic potential of *trans*-dichloridoplatinum(II) complexes with 3- and 4-acetylpyridine, Abstract book P-5, p. 74, EACR-Anticancer Agents Research Congress, Antalya, Turkey, 13-16 October **2011**.
2. L. Filipović, G. Rakić, S. Arandelović, T. Srdić, S. Bjelogrić, N. Gligorijević, M. Topalović, Ž. Tešić, S. Radulović, The mechanism of antitumor activity of *trans*-platinum(II) complexes with different pyridine ligands, Proceedings book, page 20, 8th Congress of BUON, Sibiu, Romania 8-11 September **2010**.

E. Zaključak

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je u podnetoj doktorskoj disertaciji pod naslovom „**Sinteza, karakterizacija i antitumorska aktivnost *trans*-kompleksa Pt(II) i Pt(IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima**”, kandidat, mr Gordana M. Rakić, uspešno odgovorila na sve postavljene zadatke koji se tiču sinteze *trans*-platinskih kompleksnih jedinjenja (11 kompleksa) i njihove strukturne karakterizacije (3 kristalne strukture). Takođe je ispitana *in vitro* antitumorska aktivnosti sintetisanih kompleksa koja je ukazala na značajnu antiproliferativnu aktivnost *trans*-acetilpiridinskih kompleksa platine(II) i platine(IV), dok

preostali piridin-dikarboksilato kompleksi pokazuju umerenu antiproliferativnu aktivnost prema tumorskim ćelijskim linijama. Kandidatkinja je objavila ukupno tri rada štampana u međunarodnim naučnim časopisima, od kojih su 2 direktno proistekla iz ove doktorske disertacije (oba iz kategorije M21) i dva saopštenja prezentovana na skupovima međunarodnog značaja i štampana u izvodu.

Komisija je mišljenja da je doktorska disertacija rezultat samostalnog rada i da dobijeni rezultati sadrže kvalitetan naučni doprinos iz oblasti bioneorganske hemije. Istovremeno Komisija smatra da se ova disertacija uklapa u savremene trendove neorganske hemije, dajući doprinos i sa aspekta potencijalne primene sintetisanih jedinjenja kao biološki aktivnih supstanci.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju mr Gordane M. Rakić prihvati i odobri njenu odbranu.

Komisija:

1.dr Živoslav Tešić, redovni profesor (mentor)

Hemijskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

2.dr Sanja Grgurić-Šipka, redovni profesor (mentor)

Hemijskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

3.dr Siniša Radulović, naučni savetnik

Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu

Beograd, 11.04.2017. godine