

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА
У БЕОГРАДУ

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 30.06.2016., број: 61206-3019/2-16, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер хемичара Мирјане Цветковић, истраживача сарадника Научне установе Института за хемију, технологију и металургију Института од националног значаја, Универзитета у Београду, под насловом:

„Метаболомичка студија балканских врста рода *Amphoricarpos* Vis.
(Asteraceae)“.

На основу прегледа дисертације подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Мирјане Цветковић написана је на 177 страна, А4 формата и садржи 120 слика (74 у Прилогу) и 31 табелу. Рад обухвата Увод (1 страна), Општи део (32 стране), Наши радови (65 страна), Експериментални део (26 страна), Литературу (10 страна, 112 цитата), Прилог (35 страна). Поред наведеног, дисертација садржи Извод на српском и енглеском језику (по 4 стране), Садржај (3 стране), Биографију са библиографијом (2 стране) и Захвалницу (2 стране).

Увод садржи циљ истраживања и кратак опис осталих поглавља дисертације.

Општи део садржи увод у метабономику и мултиваријантну анализу, као и опис примене метаболомике у таксономији биљака и детектовању биолошки активних једињења из биљног материјала. У овом делу приказана је систематика рода *Amphoricarpos* и ботанички опис врста овог рода. Такође су наведене до сада испитиване биолошке активности врста рода *Amphoricarpos* и сесквитерпенских лактона као активних компоненти и главних састојака.

Наши радови обухватају резултате метаболомичке анализе као хемотаксономске методе за диференцијацију врста рода *Amphoricarpus*, идентификујући сесквитерпенске лактоне гвајанолидног типа, као значајне хемотаксономске маркере. Описано је и метаболомичко детектовање и идентификовање биолошки активних компоненти, цитотоксичних на ћелијске линије аденокарцинома цервикса (HeLa) и ћелијске линије аденокарцинома плућа (A549), екстракта *Amphoricarpus autariatus* ssp. *autariatus* применом инфрацрвене и нуклеарно-магнетне резонантне спектроскопије. У овом делу такође су приказани изоловање и карактеризација сесквитерпенских лактона гвајанолидног типа (амфорикарполида) који нису раније били изоловани из врста рода *Amphoricarpus* сакупљених на различитим локалитетима у Црној Гори. У последњем сегменту овог поглавља представљени су резултати биолошких тестирања фракција *Amphoricarpus autariatus* ssp. *autariatus* на ћелије рака HeLa и A549 који су коришћени и за мултиваријантну анализу, као и резултати теста одређивања протективног ефекта на ДНК хумане лимфоците одабраних амфорикарполида.

Експериментални део обухвата приказ инструмената и хемикалија коришћених у изради ове тезе, као и детаљан опис припреме узорака, експерименталних процедура и поступака мултиваријантних статистичких анализа примењених у оквиру докторске докторске дисертације процедуре које су овде коришћене.

Лирература обухвата (114 цитата) обухвата радове из области истраживања и покрива све делове дисертације.

Прилог садржи спектралне податке испитиваних екстаката, фракција и изолованих једињења.

Б. Кратак приказ резултата

Род *Amphoricarpus*, ендемит западног Балкана, се по Blečić-у и Mayer-у дели на три таксона – две врсте *A. neumayeri* Vis. и *A. autariatus*, која се даље дели на две подврсте ssp. *autariatus* и ssp. *bertisceus*, док Webb указује само на једну врсту - *A. neumayeri* Vis. подељену у две подврсте ssp. *neumayeri* и ssp. *murbeckii* Вошпјак. Резултати скорашњих истраживања (2015) генома таксона овог рода пореклом са Балкана, спроведеног са циљем да разјасни класификацију, сугеришу да постоји само једна врста *A. neumayerianus* (Vis.) Greuter.

У овом раду су анализирана сва три таксона (према Blečić-у и Mayer-у), сакупљена на различитим локалитетима у Црној Гори у фази цветања, са циљем

стицања нових сазнања о систематизацији рода, то јест, таксономског статуса рода који још увек до краја није разјашњен. У ову сврху примењена је ^1H NMR спектроскопија комбинована са мултиваријантном анализом података – PCA (engl. Principal Component Analysis) и OPLS DA (engl. Orthogonal Partial Least Squares) статистичким методама, при чему је OPLS-DA анализа била успешна у диференцијацији испитиваних узорака на основу њихових метаболита. На овај начин је утврђено да је главна разлика између *A. autariatus* и *A. neumayeri* садржај карактеристичних сесквитерпенских лактона гвајанолидног типа (амфорикарполида). *A. neumayeri* карактеришу сесквитерпенски лактони оксидовани у положају 2, док су код обе подврсте *A. autariatus* главни амфорикарполиди оксидовани у положају 9. Овакав резултат је још једна потврда да су сесквитерпенски лактони значајни као хемотаксономски маркери у породици Asteraceae. Разликовање две подврсте *A. autariatus* ssp. *autariatus* и *A. autariatus* ssp. *bertisceus* омогућио је повећан садржај хлорогенске киселине код *A. autariatus* ssp. *bertisceus* у односу на *A. autariatus* ssp. *autariatus*, где је садржај јабучне киселине био повећан. Добијени резултати одговарају класификацији испитиваног рода по Blečić-у и Mauger-у.

Приказан је и развој метаболомичке методе за брзо откривање фармаколошки активних састојака у биљном материјалу. Екстракт *A. autariatus* ssp. *autariatus*, сакупљеног у кањону Таре у фази цветања, фракционисан је на сувој колони (engl. dry-column flash chromatography, DCFC), а издвојене фракције су тестиране на ћелије аденокарцинома цервикса (HeLa) и ћелије аденокарцинома плућа (A549). Овим тестом је утврђено да неке од испитиваних фракција показују значајну биолошку активност: на ћелијској линији HeLa најактивније фракције су показале активност у опсегу IC_{50} вредности од 8,34 до 9,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, а за ћелије A549 IC_{50} вредности најефикаснијих фракција износе 14,46 и 15,57 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Резултати цитотоксичности, као и резултати инфрацрвене и нуклеарно-магнетне резонантне спектроскопије су подвргнути мултиваријантној анализи како би се идентификовала једињења одговорна за биолошку активност у испитиваним фракцијама. Примењена је OPLS метода за корелацију хемијског састава фракција са резултатима цитотоксичности и на основу ње је утврђено да су сесквитерпенски лактони гвајанолидног типа (амфорикарполиди) одговорни за

показану биолошку активност. Инфрацрвеним спектралним подацима је нађено да ови биоактивни молекули садрже α,β -незасићену γ -лактонску групу, кључну за активност, док је NMR подацима утврђена структура ових молекула.

Поред тога, фитохемијска испитивања рода *Amphoricarpos* у овој тези обухватила су изоловање, идентификацију и карактеризацију секундарних метаболита рода са нових станишта на којима није раније прикупљан биљни материјал (Орјен и Зелетин), а поновљено је и испитивање таксона који расте у кањону Таре. Испитивани су састојци површинских воскова, за које је раније утврђено да садрже висок проценат амфорикарполида. Анализирани су метилен-хлоридни екстракти три таксона (према Влешић-у и Мауер-у): *A. neumayeri* (Ловћен), *A. autariatus* ssp. *bertisceus* (Зелетин) и *A. autariatus* ssp. *autariatus* (кањон Таре) који су сакупљени у Црној Гори у фази цветања 2011. и 2014. године. Изоловано је и окарактерисано помоћу спектра 26 сесквитерпенских лактона гвајанолидног типа – амфорикарполида, карактеристичних за овај род, од којих је осам по први пут изоловано.

Поред наведеног теста цитотоксичности одређиван је и протективни ефекат на оштећење хромозома периферних хуманих лимфоцита, коришћењем експресије микронуклуса блокирањем цитокинезе (енгл. cytochalasin-B blocked micronucleus assay, CBMN), у циљу идентификације компоненти које имају повољан терапеутски ефекат против оштећења ДНК изазваног карциногеним агенсима. Теститани су *in vitro* два 3,9,15- и два 2,3,15-триоксигенована лактона изолована из рода *Amphoricarpos*, за која се утврдило да су веома активна и да показују већу активност од амифостина, синтетичког пролека који ефикасно уклања слободне радикале и спречава оштећења ћелија. Такође је утврђено да лактони који имају хидроксилну групу у положају 9 показују већу активност од лактона код којих је хидроксилна група у положају 2.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

У ранијим фитохемијским истраживањима високопланинског ендемског рода *Amphoricarpos* са западног Балкана као главни секундарни метаболити наводе се сесквитерпенски лактони гвајанолидног типа, који су названи амфорикарполиди (укупно 29 једињења). При томе је утврђено да је највећи део

амфорикарполида депонован на површини листа, што указује на њихову заштитну улогу. У оквиру ове тезе, из три таксона, два са нових локација у Црној Гори (Орјен и Зелетин) и једног прикупљаног у кањону Таре који је и раније био истраживан, изоловано је још 8 нових амфорикарполида и окарактерисано помоћу спектра. Поред фитохемијског испитивања балканских врсти у литератури се могу наћи подаци и о недавном испитивању *Amphoricarpos elegans* сакупљеног у Грузији (западни Кавказ) из кога је изолован 3-деоксиамфорикарполид, доминантна лактонска компонента површинског екстракта. Овај лактон у хемотаксономском погледу представља везу између врста са Балкана и Кавказа.

Поред, наведеног, чисто фитохемијског дела, то јест идентификације секундарних метаболита испитиваног рода, предмет ове тезе је био нов приступ разјашњењу недоумице око таксономије рода (наведен у одељку Б овог извештаја). Метаболомичка метода (комбинација PCA, OPLS/DA, ¹H NMR) која је примењена у овој тези у циљу разрешавања овог питања, дала је резултате који су били потпуно сагласни са закључцима о постојању три таксона балканског рода *Amphoricarpos*, предложених од стране Влећић-а и Мауер-а (1967). На овај начин су успешно демонстриране могућности метаболомике за решавање таксономских проблема, при чему поступак који је овде развијен може да се примени и на друге биљне фамилије.

До сада је објављено и неколико радова о различитим биолошким активностима екстракта надземних делова рода *Amphoricarpos*. Утврђено је да су амфорикарполиди главни носиоци антибактеријских, антифунгалних, антиоксидативних и цитотоксичних активности. Предмет ове тезе било је и испитивање протективног ефекта амфорикарполида на оштећење хромозома периферних хуманих лимфоцита, коришћењем експресије микронуклеуса блокирањем цитокинезе (CBMN). Постоје подаци у литератури о протективној активности секундарних метаболита из других биљних фамилија, али ова врста биолошке активности за род *Amphoricarpos* није била раније испитивана. Тестирани амфорикарполиди показали су значајан протективни ефекат.

Откриће цитотоксичних (in vitro) активности амфорикарполида против ћелија рака HeLa i V16, наведено у литератури, довело је до идеје да се у овој дисертацији екстракт *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autaritaus* примени као модел за испитивање метаболомичке методе за брзо откривање фармаколошки активних састојака у биљном материјалу, без њиховог претходног изоловања применом

комбинације (јефтених) хроматографских техника (DCFC), спектроскопских метода (^1H NMR и IR) и биолошких тестова (на HeLa и A549 ћелије рака) интегрисаним са мултиваријантном анализом. Ова комбинација показала се врло успешном, а као носиоци цитотоксичних активности идентификоване су су фракције у којима преовлађују амфорикарполиди који садрже егзометиленску 11,13-двогубу везу коњуговану са лактонским карбонилем. Посебно би требало да се истакне оригиналност и универзалност методе која није ограничена само на испитивани род који је послужио као модел.

Г. Објављени радови и саопштења која чине део дисертације

1) Објављени радови

1. **Cvetković Mirjana**, Đorđević Iris, Jadranin Milka, Vajs Vlatka, Vučković Ivan, Menković Nebojša, Milosavljević Slobodan, Tešević Vele, (2014) Further amphoricarpolides from the surface extracts of *Amphoricarpus* complex from Montenegro, *Chemistry and Biodiversity*, 11 (9) 1428-1437. (M22) IF=1,515

<https://doi.org/10.1002/cbdv.201400101>

2. **Mirjana Cvetković**, Boban Anđelković, Vladimir Stevanović, Milka Jadranin, Iris Đorđević, Vele Tešević, Slobodan Milosavljević, Dejan Gođevac, (2018) NMR-based metabolomics study of *Amphoricarpus* species from Montenegro, *Phytochemistry Letters*, 25 1–5. (M23) IF= 1,338

<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.03.013>

2) Саопштења

1. Dejan Gođevac, Boban Anđelković, Milka Jadranin, **Mirjana Cvetković**, Slobodan Milosavljević. NMR-Based metabolomics of *Amphoricarpus* species from Montenegro. International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf (INCPU), 14-17 Oktobar 2015, Plovdiv, Bulgaria, Book of Abstracts, PP78. (M34)

2. **Mirjana Cvetković**, Ana Damjanović, Tatjana Stanojković, Boban Anđelković, Slobodan Milosavljević, Dejan Gođevac, NMR-based metabolic combined with dry-column flesh chromatography to identify cytotoxic metabolites from *Amphoricarpus autariatus*, Book of Abstracts, 8th International Conference on Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine, 6-9 September 2018, Andros, Greece. (M34)

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност докторске дисертације Мирјане Цветковић проверена је 05.08.2019. године на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду. Бр. 204/22.06.2018.). Помоћу програма iThenticate, утврђено је да степен подударности текста износи 11%, што је последица цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. овог правилника.

Комисија сматра да је докторска дисертација Мирјане Цветковић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

На основу изложеног, може се закључити да је у дисертацији под насловом „**Метаболомичка студија балканских врста рода *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae)**“ кандидат Мирјана Цветковић успешно испунила постављене циљеве који се односе на развој метаболичких метода за испитивање хемотаксономије рода *Amphoricarpos* и идентификацију биоактивних компоненти екстракта овог рода. Примењене метаболичке методе су обухватиле сектроскопске и хроматографске технике комбиноване са мултиваријантном анализом, као и изоловање и идентификацију једињења и одређивање биолошке активности испитиваног рода. Применом спектроскопских и спектрометријских метода изоловала је и окарактерисала, укупно 26 секундарних метаболита – амфорикарполида - из овог рода, од којих је 8 нових природних производа.

Резултати истраживања проистекли из ове дисертације су објављени у једном раду у истакнутом међународном часопису (M22) и у једном раду у међународном часопису (M23) и приказани на два скупа међународног значаја штампаних у изводу (M34).

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Мирјане Цветковић под насловом „**Метаболомичка студија балканских врста рода**

Amphoricarpus Vis. (Asteraceae)“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора хемијских наука.

У Београду

08.08.2019.

Комисија:

Др Веле Тешевић, редовни професор
Хемијски факултет- Универзитет у Београду

Др Ирис Ђорђевић, ванредни професор
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Др Слободан Милосављевић, професор емеритус
Академик Српске академије науке и уметности

Др Дејан Гођевац, научни саветник
Институт за хемију, технологију и металургију

Др Петар Марин, редовни професор
Билошки факултет-Универзитет у Београду