

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 08.07.2021. године, одлука бр. 477/7, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер хемичара Иване Софренић, асистента Универзитета у Београду - Хемијског факултета, под насловом:

### **„Изоловање, идентификација и цитотоксична активност секундарних метаболита плодноносних тела *Fomitopsis betulina* и примена HR MAS NMR спектроскопске технике у одређивању метаболичког профила“**

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 26.11.2020. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације под редним бројем 61206-2414/4-20.

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно – научном већу подноси следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **А. Приказ садржаја дисертације**

Докторска дисертација Иване Софренић написана је на 166 страна А4 формата (фонт *Times New Roman*, величина 12 pt, проред 1, маргине 2 cm) и садржи 146 слика и 29 табела. Рад обухвата следећа поглавља: Увод (1 страна), Општи део (26 страна), Наши радови (118 страна), Експериментални део (11 страна), Закључак (2 стране) и Литература (8 страна, 139 цитата). Поред наведеног, дисертација садржи Захвалницу, Сажетак на српском и енглеском језику (по 2 стране), Садржај (3 стране), Списак симбола и скраћеница (2 стране), Биографију кандидаткиње (1 страна), Списак објављених и саопштених радова проистеклих из дисертације (1 страна), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

У **УВОДУ** су дефинисани предмет и циљ истраживања и дат је опис и садржај осталих поглавља ове дисертације.

У **ОПШТЕМ ДЕЛУ** приказан је краћи осврт на царство гљива, њихове основне карактеристике, животни циклус, класификацију и улогу у традиционалној медицини. Детаљно је описана гљива *Fomitopsis betulina*, њен животни циклус и примена у традиционалној медицини. Описани су примарни и секундарни метаболити гљива и њихова биолошка активност. Дат је приказ изолованих секундарних метаболита тритерпенског типа најпознатијих представника европских гљива рода *Fomitopsis*: *F. officinalis*, *F. pinicola*, *F. betulina* и *F. palustris*. Приказани су до сада изоловани тритерпени ланостанског типа и извршена је њихова класификација на основу положаја двоструких веза, оксидације, гликозилације бочног низа, као и других структурних карактеристика и приказана у 9 табела. У наставку овог поглавља дати су општи принципи HR MAS NMR спектроскопије као и њена примена у метаболомици. Дат је осврт на досадашња истраживања која су се бавила применом ове инструменталне технике у биљној метаболомици.

Оригинални научни допринос ове дисертације детаљно је објашњен у поглављу **НАШИ РАДОВИ**. У овом поглављу је приказан поступак прикупљања, припреме и идентификације плодноних тела из природе као и поступак гајења гљиве у лабораторијским условима.

Детаљно су описани поступци пречишћавања, изоловања и карактеризације једињења тритерпенског типа из етил-ацетатне фракције почетног екстракта. У оквиру ове дисертације укупно је изоловано 31 једињење овог типа, од тога 13 једињења је по први пут описано у литератури (полипоренске киселине Е-Л (**19-26**), полипоренска киселина М (**30**), фомитозиди Л-Н (**27-29**) и фомитозид О (**31**). Структуре изолованих једињења одређене су применом 1D ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ) и 2D (COSY, TOCSY, 2DJ, NOESY, HSQC и HMBC) NMR спектроскопских техника, као и применом IR спектроскопије, масене спектрометрије високе резолуције (HR-ESI-MS) и полариметрије.

Дат је приказ биолошких активности изолованих једињења. Испитана је цитотоксична активност на ћелијама акутне промијелоцитне леукемије HL-60 и аденокарцинома плућа A549, и одређена је DNK протективна активност на хуманим лимфоцитима.

За плодносна тела добијена култивацијом на четири алтернативна супстрата, на којима *F. betulina* до сада није гајена, приказани су метаболомички профили применом HR MAS NMR и FTIR спектроскопије и дата њихова анализа.

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО** обухвата детаљне информације о коришћеним апаратима и растварачима, поступку гајења, пореклу коришћеног биолошког материјала, поступке екстракције и пречишћавања, начину припреме узорака за појединачне анализе, као и примењеним статистичким методама у биолошким тестовима и метаболомичкој анализи. У овом поглављу дати су параметри снимања за сваку од примењених инструменталних техника.

У **ЗАКЉУЧКУ** су сумирани најважнији резултати хемијских и биолошких испитивања *F. betulina*. По први пут је код добијена плодносна тела, култивацијом на алтернативним супстратима и применом FTIR и HR MAS NMR спектроскопских техника у комбинацији са мултиваријантном анализом доказано да сазревањем и променом подлоге за гајење, долази до промене хемијског састава.

У делу **ЛИТЕРАТУРА** налази се укупно 139 референци наведених на основу редоследа појављивања у тексту.

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

У овој дисертацији приказан је поступак изоловања и карактеризације једињења тритерпенског типа из плодносних тела медицинске гљиве *F. betulina* прикупљених из природе. Из етил-ацетатне фракције почетног екстракта изоловано је 31 једињење тритерпенског типа од чега 13 до сада није било описано у литератури. Детаљно је описана њихова хемијска карактеризација употребом стероскопских техника, 1D ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ) и 2D (COSY, TOCSY, 2DJ, NOESY, HSQC и HMBC) NMR, FTIR и UV/Vis спектроскопијом, као и масеном спектрометријом високе резолуције (HR-ESI-MS) и полариметријом. У процесу изоловања триперпена, за почетно фракционисање, коришћена је колонска хроматографија, док су високоефикасна течна хроматографија и препаративна танкослојна хроматографија коришћене за изоловање једињења високог степена чистоће.

Од укупно 31 изолованог једињења за 30 (**1-11** и **13-31**) испитана је њихова цитотоксичност на ћелијским линијама промијелоцитне леукемије HL-60 и аденокарцинома плућа A549. Као позитивна контрола коришћен је синтетички антиканцерогени агенс цисплатин. Такође је за 28 једињења одређен и индекс селективности у односу на здраве ћелије (MRC-5). Два тритерпенска гликозида (**27** и **29**) која до сада нису описана у литератури показала су значајну цитотоксичну активност на ћелијској линији HL-60, али због мале количине није одређен њихов индекс

селективности. Још пет изолованих једињења (**3**, **5**, **7**, **10** и **14**) имало је IC<sub>50</sub> вредност мању од 20 µМ на HL-60 од чега су два (**5** и **10**) имала висок индекс селективности 8,6 и 9,8 у односу на цисплатин. Сва тестирана једињења нису показала значајну цитотоксичну активност у односу на A549 ћелијску линију.

ДНК протективна активност је испитана за 12 изолованих једињења (**3-6**, **9-12**, **16**, **18**, **20** и **21**) на хуманим лимфоцитима периферне крви. Као позитивна контрола коришћен је амифостин, а као негативна митомицин Ц. Одређен је индекс пролиферације за сва тестирана једињења и утврђено је да ниједно од њих не узрокује значајно смањење броја третираних ћелија. Резултати теста су указали на *in vitro* заштитни ефекат третираних једињења према хромозомским аберацијама и да доводе до значајног смањења броја микронуклеуса у третираним ћелијама. Показано је да постоји дозна зависност као и веза између структуре и активности.

Успешно су добијена плодносна тела *F. betulina* гајењем на алтернативним супстратима (пиљевина стабала брезе (*Betula alba*), руја (*Cotinus coggygria*), црне јове (*Alnus glutinosa*) и печена унутрашња љуска лешника (*Corylus avellana*), у лабораторијским условима. Промене метаболичких профила тако добијених плодносна тела праћене су применом HR MAS NMR и FTIR спектроскопским техникама. Добијени су OPLS-DA модели чијом анализом је показано од каквих промена у хемијском саставу долази приликом развоја плодносна тела као и променом супстрата на којима се гаје.

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

Досадашња истраживања на пољу анализе секундарних метаболита *F. betulina* указују на присуство титерпена ланостанског типа.<sup>1,2</sup> У току израде ове дисертације, кандидаткиња је изоловала и окарактерисала 13 нових тритерпенских деривата ланостанског типа и 18 познатих једињења. Једињења **19-29** поседију 24-ментиленланоста-8-енски скелет карбоксилне киселине и могу се поделити на 26-ланостанске (**19-23**) и 21-ланостанске (**24-29**) киселине. Једињење **30** у својој структури има Δ<sup>7,9(11)</sup> диенски систем. У овој дисертацији су по први пут из ове гљиве изоловани тритерпенски гликозиди, и исто тако је по први пут изолован гликозид са 24-метилен-3,4-*seco*-ланостанским скелетом (**31**). Изолована су и два тритерпенска деривата са оксалном киселином у структури, тритерпенски деривати који су иначе јако ретки у природи, од

којих једињење **19** у положају **3** поседује метил оксалатни естар који до сада није описан у литератури, код овог типа једињења.

У литератури је описана цитотоксична активност за одређена једињења овог типа према ћелијским линијама промијелоцитне леукемије HL-60 и аденокарцинома плућа A549.<sup>2,3</sup> У свом раду, кандидаткиња је приказала резултате активности изолованих једињења према овим ћелијским линијама, од којих су нека имала IC<sub>50</sub> вредност мању од 20  $\mu$ M на HL-60 што је у сагласности са резултатима других аутора на истом типу једињења.<sup>2</sup> Иако у литератури постоје подаци да одређени ланостански тритерпени имају цитотоксичну активност према ћелијској линији A549 тестирана једињења у овој дисертација нису показивала значајну активност.<sup>3</sup>

У оквиру овог истраживања испитана је и ДНК протективна активност за 12 једињења изолованих из плодноносних тела *F. betulina*. Кандидаткиња је у оквиру своје дисертације показала да тестирани ланостански тритерпени доводе до смањења броја микронуклеуса у истом или већем обиму као и комерцијални стандард, амифостин.<sup>4</sup>

Гајење *F. betulina* у експерименталним условим, на основу доступних литературних података, се показало као велики изазов.<sup>5,6</sup> До сада су само у два случаја са успехом добијена плодносна тела на супстрату на којем се ова гљива може наћи у природи. Литературни подаци указују да подлога за гајење утиче на хемијски састав, а самим тим и метаболомички профил плодноносних тела, што је показала и студија гајених *Ganoderma lucidum* базидиокарпа.<sup>7</sup> Све ово је било инспирација за идеју добијања плодноносних тела *F. betulina* гајењем на алтернативним супстратима који представљају отпадне сировине прехранбене и дрвне индустрије, али и лако доступне сировине. Успешно плодношење *F. betulina* на алтернативним супстратима до сада није описано у литератури.

Коришћењем доступних литературних података за примену HR MAS NMR и FTIR спектроскопских техника за добијање матаболичких профила биљака искоришћено је као основа за резултате приказане у овом раду.<sup>8</sup> Овде је по први пут примењен метаболомички приступ за праћење промена у хемијском саставу током сазревања плодноносних тела, као и поређења метаболомичких профила гљива у зависности од супстрата на којима су гајене. Анализим VIP-pred скорова и S-графика добијених OPLS-DA модела идентификоване су променљиве које су карактеристичне за одређени стадијум развоја. Маркери гајења плодноносних тела на одређеном супстрату дефинисани су анализом SUS графика OPLS-DA модела. Резултати HR MAS NMR и FTIR спектроскопских техника и SIMCA предикционог модела указују да се FTIR

спектроскопска техника може успешно користити за одређивање фазе сазревања плодноносних тела *F. betulina*.

### Литература:

1. Grienke U., Zöll M., Peintner U., Rollinger J. (2014) European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. *J. Ethnopharmacol.* 154, 564–583  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.030>
2. Tohtahon Z., Xue J., Han J., Liu Y., Hua H., Yuan T. (2017) Cytotoxic lanostane triterpenoids from the fruiting bodies of *Piptoporus betulinus*. *Phytochemistry* 143, 98–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.07.013>
3. Zhou L., Zhang Y., Gapter L.A., Ling H., Agarwal R., Ng KY. (2008) Cytotoxic and anti-oxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from *Poria cocos*. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 1459-1462.  
<https://doi.org/10.1248/cpb.56.1459>
4. Godevac D., Tesevic V., Vajs V., Milosavljevic S., Stankovic M., (2013) Antioxidant evaluation of heterocyclic compounds by cytokinesis-block micronucleus assay. *Mini-Rev. Med. Chem.* 13, 431-438.  
<https://doi.org/10.2174/138955713804999856>
5. Cyranka M, Graz M, Kaczor J, Kandefor-Szerszen' M, Walczak K, Kapka-Skrzypczak L. (2011) Investigation of antiproliferative effect of ether and ethanol extracts of Birch polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes) in vitro grown mycelium. *Int. J. Med. Mushrooms* 13, 525–533  
<https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v13.i6.40>
6. Ka H-K, Ryu S-R, Lee B-H, Yoon K-H, Bak W-C (2008) Log cultivation of the birch fungus *Piptoporus betulinus* using *Betula davurica*. *Korean J Mycol* 36, 98–100.  
<https://doi.org/10.4489/KJM.2008.36.1.098>
7. Cilerdzic J., Sofrenic I., Tesevic V., Brceski I, Duletic-Lausevic S., Vukojevic J., Stajic M. (2018) Neuroprotective Potential and Chemical Profile of Alternatively Cultivated *Ganoderma lucidum* Basidiocarps. *Chem. Biodivers.* 15, e1800036.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201800036>
8. Augustijn D., de Groot H.J.M., Alia A. (2021) HR-MAS NMR Applications in Plant Metabolomics. *Molecules* 26, 931.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26040931>

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

Део резултата ове докторске дисертације је објављен у врхунском међународном часопису (један рад М21), међународном часопису (један рад М23), саопштењу на међународном скупу, штампаном у изводу (М34) и саопштењу на скупу од националног значаја, штампаном у изводу (М64).

### Рад у врхунском међународном часопису (М21):

1. **Ivana Sofrenić**, Boban Anđelković, Nina Todorović, Tatjana Stanojković, Ljubodrag Vujisić, Miroslav Novaković, Slobodan Milosavljević, Vele Tešević (2021) Cytotoxic triterpenoids and triterpene sugar esters from the medicinal mushroom *Fomitopsis betulina*. *Phytochemistry* 181, (IF<sub>2020</sub> 4,072; 44/235 Plant Sciences).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112580>

### Рад у међународном часопису (М23):

1. **Ivana Sofrenić**, Boban Anđelković, Ljubodrag Vujisić, Miroslav Novaković, Aleksandar Knežević, Miroslava Stanković, Slobodan Milosavljević, Vele Tešević (2021) DNA protective activity of triterpenoids isolated from medicinal mushroom *Fomitopsis betulina*. *J. Serb. Chem. Soc.* (IF<sub>2020</sub> 1,240; 141/178 Chemistry, Multidisciplinary).

<https://doi.org/10.2298/JSC210401039S>

### Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (М34):

1. **Ivana Sofrenić**, Ljubodrag Vujisić, Miroslav Novaković, Nina Todorović, Milka Jadranin, Dejan Gođevac, Boban Anđelković, Slobodan Milosavljević, Vele Tešević, New Triterpenoid Acids from Fungus *Fomitopsis betulina*, Fourth International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf, May, 2019, Albena, Bulgaria. ISBN 2682-9487

### Саопштење са скупа од националног значаја штампано у изводу (М64):

1. **Ivana Sofrenić**, Ljubodrag Vujisić, Miroslav Novaković, Boban Anđelković, Vele Tešević, Izolovanje i identifikacija triterpenskih kiselina iz gljive *Piptoporus betulinus*, 54. Savetovanje SHD, Septembar, 2017, Beograd, Srbija. ISBN 978-86-7132-067-2

## Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације проверена је 23.08.2021. године на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду. Помоћу програма *iThenticate*

утврђено је да количина подударања текста износи 15%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом дисертације, као и да је појединачно највеће подударање текста са претходно публикованим резултатима истраживања проистеклих из дисертације (4%), што је у складу са чланом 9. овог правилника. Комисија сматра да је докторска дисертација Иване Софренић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

## Б. Закључак

Комисија сматра да докторска дисертација „Изоловање, идентификација и цитотоксична активност секундарних метаболита плодноносних тела *Fomitopsis betulina* и примена HR MAS NMR спектроскопске технике у одређивању метаболичког профила” кандидаткиње Иване В. Софренић, мастер хемичара, представља научно вредан допринос у познавању састава секундарних метаболита медицинске гљиве *Fomitopsis betulina* и њених метаболичких профила. Комисија је такође закључила да је кандидаткиња успешно остварила све задате циљеве. Применом спектроскопских и спектрометријских метода изоловала је и окарактерисала, укупно 31 секундарни метаболит тритерпенског типа из плодноносних тела прикупљених из природе од којих 13 до сада нису описани у литератури. Одредила је цитотоксичну и ДНК протективну активност за већину изолованих једињења. Показала је да се HR MAS NMR и FTIR спектроскопске технике могу успешно користити за праћење промена у хемијском саставу плодноносних тела током процеса сазревања, као и гајењем на алтернативним супстратима.

Постигнути резултати су објављени у два научна рада на којима је кандидаткиња први аутор, један у врхунском међународном часопису (M21) и један у међународном часопису (M23). Такође, кандидаткиња је аутор једног саопштења са међународног скупа штампаног у изводу (M34) које је добило награду Бугарског фитохемијског друштва за најбоље постерско саопштење (<http://www.icnpu.com/2019/files/files/ICNPU-2019%20Awardees.pdf>) и једног саопштења са скупа од националног значаја штампаног у изводу (M64).

Комисија сматра да постигнути резултати поднети у приложеној тези представљају значајан допринос у области истраживања секундарних метаболита медицинских гљива. Примена методологије добијања плодноносних тела *F. betulina* приказане у овој дисертацији отвара ново поље истраживања ове медицинске гљиве и очувања њених природних станишта. Примењене спектроскопске технике и статистичке методе указују на њихов неискоришћени потенцијал на пољу праћења промена у плодноносним телима гљива насталих гајењем на алтернативним супстратима и за одређивање њихове старости.

На основу свега наведеног, а у складу са Законом о високом образовању, Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да, поднету докторску дисертацију Иване В. Софренић под насловом „**Изоловање, идентификација и цитотоксична активност секундарних метаболита плодноносних тела *Fomitopsis betulina* и примена HR MAS NMR спектроскопске технике у одређивању метаболичког профила**” прихвати и одобри реферат и одбрану за стицање академског звања доктора хемијских наука.

Београд, 30.08.2021.

Чланови комисије:

---

др Љубодраг Вујисић, ванредни професор (ментор)  
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

---

др Мирослав Новаковић, виши научни сарадник (ментор)  
Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију  
Институт од националног значаја за Републику Србију

---

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

---

др Нина Тодоровић, научни саветник  
Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију  
Институт од националног значаја за Републику Србију

---

др Александар Кнежевић, научни сарадник  
Универзитет у Београду - Биолошки факултет