

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Презиме, име једног родитеља и име	Милтојевић (Бранислав) Ана	
Датум и место рођења	19.06.1985. године, Ниш	
Основне студије		
Универзитет	Универзитет у Нишу	
Факултет	Природно-математички факултет	ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ - НИШ ПРИМЕНА: 01.4.2016. УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ 01 1190
Студијски програм	Хемија	
Звање	Дипломирани хемичар	
Година уписа	2004.	
Година завршетка	2009.	
Просечна оцена	9,76 (девет, 76/100)	

Магистер студије, магистарске студије

Универзитет	
Факултет	
Студијски програм	
Звање	
Година уписа	
Година завршетка	
Просечна оцена	
Научна област	
Наслов завршног рада	

Докторске студије

Универзитет	Универзитет у Нишу
Факултет	Природно-математички факултет
Студијски програм	Хемија
Година уписа	2009.
Остварен број ЕСПБ бодова	150
Просечна оцена	10,00 (десет)

НАСЛОВ ТЕМЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов теме докторске дисертације	Секундарни метаболити биљне врсте <i>Choisya ternata</i> Kunth (Rutaceae): изоловање, синтеза, спектрална карактеризација и биолошка активност
Име и презиме ментора, звање	Нико Радуловић, ванредни професор
Број и датум добијања сагласности за тему докторске дисертације	8/17-01-011/12-008, 24.12.2012. године

ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Број страна	337
Број поглавља	12
Број слика (шема, графикона)	103
Број табела	34
Број прилога	129

**ПРИКАЗ НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КАНДИДАТА
који садрже резултате истраживања у оквиру докторске дисертације**

Р. бр.	Аутор-и, наслов, часопис, година, број волумена, странице	Категорија
1	<p><u>Miltojević, A. B.; Radulović, N. S.</u> Structural elucidation of thermolysis products of methyl <i>N</i>-methyl-<i>N</i>-nitrosoanthranilate. <i>RSC Advances</i>, 2015, 5 (66), 53569-53585.</p> <p>У раду је утврђено да метил-<i>N</i>-метил-<i>N</i>-нитрозоантранилат при условима гасне хроматографије подлеже потпуној термалној деградацији дајући метил-<i>N</i>-метилантранилат и производ купловања 2,2'-(1,2-диметилхидразин-1,2-диил)добензоат. У циљу потврде структуре производа купловања, изведена је препаративна термолита метил-<i>N</i>-метил-<i>N</i>-нитрозоантранилата, при чему је међу 46 производа, идентификован и потпуно спектрално окарактерисан нови производ кондензације, метил-5-метил-6-оксо-(5<i>H</i>)-фенантридин-4-карбоксилат, док 2,2'-(1,2-диметилхидразин-1,2-диил)добензоат није детектован. Пажљивим разматрањем структура идентификованих производа, предложени су главни путеви термолитизе метил-<i>N</i>-метил-<i>N</i>-нитрозоантранилата у парној и кондензованој фази. Производи се могу поделити на оне који настају раскидањем N-NO, односно Ar-NO везе (тј. на деривате антранилне и бензоеве киселине).</p>	M21
2	<p><u>Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; McDermott, M.; Waldren, S.; Parnell, J. A.; Gomes Pinheiro, M. M.; Fernandes, P. D.; de Sousa Menezes F.</u> Identification of a new antinociceptive alkaloid isopropyl <i>N</i>-methylantranilate from the essential oil of <i>Choisya ternata</i> Kunth. <i>Journal of Ethnopharmacology</i>, 2011, 135 (3), 610-619.</p> <p>Анализом хемијског састава (GC и GC-MS) етарског уља листова мексичке наранџе, <i>Choisya ternata</i> Kunth (Rutaceae), међу 157 састојака, идентификован је изопропил-<i>N</i>-метилантранилат, нови природни протоалкалоид, назван тернантранин. Изведена је синтеза изопропил-<i>N</i>-метилантранилата, као и аналогног метил-<i>N</i>-метилантранилата (такође детектованог у анализираном етарском уљу) и пропил-<i>N</i>-метилантранилата. Синтетисана једињења су потпуно спектрално окарактерисана и тестирана је њихова централна и периферна антиноцицептивна активност. Сва једињења у дози од 3 mg/kg су била активнија од аспирина у дози од 200 mg/kg у првом тесту и приближно активна као морфин у дози од 5 mg/kg у другом тесту. Овим је оправдана етнофармаколошка употреба мексичке наранџе.</p>	M21
3	<p><u>Gomes Pinheiro, M. M.; Miltojević, A. B.; Radulović, N. S.; Abdul-Wahab, I. R.; Boylan, F.; Fernandes, P. D.</u> Anti-inflammatory activity of <i>Choisya ternata</i> Kunth essential oil, ternantranin, and its two synthetic analogs (methyl and propyl <i>N</i>-methylantranilates). <i>PLoS One</i>, 2015, 10 (3), e0121063.</p> <p>У овом раду је проучавано анти-инфламаторно дејство етарског уља листова биљне врсте <i>Choisya ternata</i> Kunth (Rutaceae), састојка овог етарског уља, изопропил-<i>N</i>-метилантранилата (тернантранина), као и његова два синтетска аналога, метил- и пропил-<i>N</i>-метилантранилата. Анти-инфламаторно дејство је проучавано на мишевима на неколико модела инфламације, као што су формалински модел и модел поткожних ваздушних џепова, уз мерење миграције ћелија, запремине ексудата, екстравазације протеина, азот(II)-оксида и про-инфламаторних цитокина. Изопропил-, метил- и пропил-<i>N</i>-метилантранилати су испољили анти-инфламаторно дејство (1–30 mg/kg, <i>p.o.</i>) у знатно мањим дозама у односу на етарско уље (3–100 mg/kg, <i>p.o.</i>).</p>	M21
4	<p><u>Gomes Pinheiro, M. M.; Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; Boylan, F.; Fernandes, P. D.</u> Antinociceptive esters of <i>N</i>-methylantranilic acid: Mechanism of action in heat-mediated pain. <i>European Journal of Pharmacology</i>, 2014, 727, 106-114.</p> <p>Показано је да изопропил-, метил- и пропил-<i>N</i>-метилантранилат испољавају периферну антиноцицептивну активност у моделима формалином, капсаицином и глутаматом изазване ноцицепције и вруће плоче, као и дозно-зависну спиналну антиноцицептивну активност у моделу наглог покрета репом. Проучаван је механизам антиноцицептивног дејства ових једињења. Уочено је да глибенкламид смањује антиноцицептивни ефекат изопропил-<i>N</i>-метилантранилата што указује на учешће K⁺ATP канала у његовој активности. Антиноцицептивни ефекат метил- и пропил-<i>N</i>-метилантранилата може бити повезан са адренергичним, нитрергичним и серотонинергичним путевима, а чињеница да налоксон смањује антиноцицептивно дејство пропил-<i>N</i>-метилантранилата указује да су за његово дејство заслужни и опиоидни рецептори. Механизам дејства поменутих антранилата није повезан са холинергичним и канабиноидним системима.</p>	M22
5	<p><u>Radulović, N. S.; Randjelović, P. J.; Stojanović, N. M.; Ilić, I. R.; Miltojević, A. B.; Stojković, M. B.; Ilić, M.</u> Effect of two esters of <i>N</i>-methylantranilic acid from Rutaceae species on impaired kidney morphology and function in rats caused by CCl₄. <i>Life Sciences</i>, 2015, 135, 110-117.</p> <p>Испитивано је нефропротективно дејство изопропил- и метил-<i>N</i>-метилантранилата у моделу оштећења бубрега пацова изазваног угљен-тетрахлоридом, као и њихова антиоксидантна активност у више различитих модела. Када је животињама пре угљен-тетрахлорида дат метил-<i>N</i>-метилантранилат значајно се смањи пораст нивоа урее и креатинина (који указује на смањену функцију бубрега), што није случај са изопропил-<i>N</i>-метилантранилатом. Хистопатолошке анализе бубрега су показале да метил-<i>N</i>-метилантранилат смањује инциденцу лезија бубрега. Поред тога, утврђено је да изопропил- и метил-<i>N</i>-метилантранилат, чак и у највишим тестираним дозама, не оштећују значајно ткиво бубрега.</p>	M22
6	<p><u>Radulović, N. S.; Jovanović, I.; Ilić, I. R.; Randjelović, P. J.; Stojanović, N. M.; Miltojević, A. B.</u> Methyl and isopropyl <i>N</i>-methylantranilates attenuate diclofenac- and ethanol-induced gastric lesions in rats. <i>Life Sciences</i>, 2013, 93 (22), 840-846.</p> <p>Испитано је гастропротективно дејство изопропил- и метил-<i>N</i>-метилантранилата. Орална апликација ових антранилата, чак и у високом дозама (200 mg/kg), није довела до појаве лезија на желуцу, а оба природна алкалоида су испољила значајну антиулцерозну активност, чак и у нижим дозама (50 mg/kg). Ова једињења смањују број лезија на желуцу пацова које су изазване диклофенаком или етанолом. С обзиром да су изопропил- и метил-<i>N</i>-метилантранилат испољили низ фармаколошких активности и да је њихова синтеза јефтина и једноставна, ова два једињења би могла да представљају алтернативу у лечењу чира на желуцу и/или нове, безбедније нестероидне анти-инфламаторне лекове.</p>	M22

	Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; Randjelović, P. J.; Stojanović, N. M.; Boylan, F. Effects of methyl and isopropyl <i>N</i> -methylantranilates from <i>Choisya ternata</i> Kunth (Rutaceae) on experimental anxiety and depression in mice. <i>Phytotherapy Research</i> , 2013, 27 (9), 1334–1338.	
7	Испитивано је анксиолитичко и антидепресивно дејство (тест отвореног поља, хоризонталне жице, светло/тама, принудног пливања и вешања о реп) изопропил- и метил- <i>N</i> -метилантранилата код мишева, као и њихов утицај на време потребно да миш заспи и на дужину сна изазваног дијазапамом. Ови испарљиви алкалоиди (50–200 mg/kg, <i>i.p.</i>) су показали и значајну анксиолитичку и антидепресивну активност, у свим тестраним дозама, а нису испољили миорелаксантно дејство, нити утицали на локомоторну активност животиња. Сами антранилати не утичу на време потребно да миш заспи, али продужавају време сна изазваног дијазапамом на дозно-зависан начин, што указује да делују на γ -аминобутерни рецепторски систем.	M22
8	Radulović, N. S.; Randjelović, P. J.; Stojanović, N. M.; Ilić, I. R.; Miltojević, A. B. Influence of methyl and isopropyl <i>N</i> -methyl antranilates on carbon tetrachloride-induced changes in rat liver morphology and function. <i>Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology</i> , 2013, 11 (1), 67-73.	M51
9	Miltojević, A. B.; Radulović, N. S. Complete assignment of ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of anthranilic acid and its hydroxy derivatives and salicylic acid and its amino derivatives. <i>Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology</i> , 2015, 13 (2), 121-132.	M51
	У овом раду дати су NMR подаци за антранилну, салицилну и региоизомерне (амино)хидроксибензоове киселине, 3-хидроксиантранилну, 5-хидроксиантранилну, 4-аминосалицилну и 5-аминосалицилну киселину. Како је претрагом литературе утврђено да су до сада објављени NMR подаци за поменуте деривате бензоове киселине непотпуни, неасигнирани или чак и погрешно асигнирани, извршена је комплетна асигнација сигнала у ^1H - и ^{13}C - NMR спектрима снимљеним у деутерисаном диметил-сулфоксиду (DMSO- d_6) комбиновањем података из ^1H - и ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY, NOESY, HSQC и HMBC експеримента.	

НАПОМЕНА: уколико је кандидат објавио више од 3 рада, додати нове редове у овај део документа

ИСПУЊЕНОСТ УСЛОВА ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидат испуњава услове за оцену и одбрану докторске дисертације који су предвиђени Законом о високом образовању, Статутом Универзитета и Статутом Факултета.

ДА НЕ

Ана Милтојевић је аутор или коаутор 7 радова објављених у међународним часописима (3 рада категорије M21 и 4 рада категорије M22) и 2 рада објављена у часопису националног значаја (катеорије M51), који садрже резултате истраживања која су спроведена у оквиру ове докторске дисертације. Она је први аутор на једном раду M21 категорије и једном раду M51 категорије. Такође, кандидаткиња је до сада објавила и 6 научних радова (по 2 рада категорија M21, M22 и M23), који нису део ове докторске дисертације, али су из одговарајуће научне области. Резултате својих истраживања, кандидаткиња је саопштила и на 7 међународних научних конференција у Италији, Пољској, Аустрији, Португалији, Турској и Бугарској, као и на већем броју националних конференција (радови штампани у изводу).

ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кратак опис појединих делова дисертације (до 500 речи)

Докторска дисертација Ане Милтојевић се састоји од следећих поглавља: 1. Увод, 2. Циљеви рада, 3. Општи део, 4. Експериментални део, 5. Резултати и дискусија, 6. Извод, 7. Summary (извод на енглеском језику), 8. Литература, 9. Прилог, 10. Биографија аутора, 11. Библиографија аутора и 12. Изјаве аутора.

У поглављима Увод и Циљеви рада описана је проблематика којом се кандидат бави, изнешене су главне идеје и прецизно су дефинисани циљеви дисертације и методологија рада. Треће поглавље (Општи део) је уводног карактера и у њему је дат исцрпни преглед досадашњих сазнања везаних за разноврсност секундарних метаболита које биосинтетише биљна врста *Choisya ternata*, као и преглед особина, начина за добијање и реакција којима подлеже антранилна киселина (нарочита пажња је посвећена (транс)естерификацији и добијању *N*-алкил деривата). Део овог поглавља је посвећен и *N*-нитрозо једињењима. Дат је и осврт на природне производе као потенцијалне терапеутике за третман различитих дисфункција система и органа.

У Експерименталном делу су дате информације о испитиваном узорку *C. ternata*, о начину припреме и обраде биљног материјала, примењеним синтетским поступцима (синтеза изопропил-, метил- и пропил-*N*-метилантранилата, синтеза и термална деградација метил-*N*-метил-*N*-нитрозоантранилата), као и о примењеним методама раздвајања и анализе. Поред тога, наведени су и спектрални подаци за сва синтетисана и изолована једињења. Описане су и процедуре коришћене приликом тестирања антиоксидантне и биолошких активности и

начин испитивања метаболизма ових једињења код пацова.

У петом поглављу (*Резултати и дискусија*) су изложени и дискутовани резултати остварени у овој докторској дисертацији. Анализом хемијског састава (GC и GC-MS) етарског уља листова биљне врсте *C. ternata*, међу 157 састојака, идентификован је изопропил-*N*-метилантранилат, нови природни протоалкалоид, који је назван тернантранин. Извршена је његова синтеза редукцијом *in situ* генерисаног имида метил-антранилата и формалдехида, при чему је добијен метил-*N*-метилантранилат (такође детектован у анализираном етарском уљу), који је трансестерификован одговарајућим алкоксидом. С обзиром на етнофармаколошку примену ове биљне врсте, испитане су: антиоксидантна, антимикробна и низ *in vivo* фармаколошких активности изопропил- и метил-*N*-метилантранилата. Оба естра су показала значајну антиноцицептивну активност (чак и у дози од 0,3 mg/kg т.м., *p.o.*) код мишева. Утврђено је да поседују и анксиолитичко и антидепресивно дејство, да немају успављујуће дејство, али да продужавају време дијазепамом-узрокованог сна (50–200 mg/kg т.м., *i.p.*) мишева. У дозама од 200 mg/kg т.м. (*i.p.*), оба испарљива алкалоида, иако се нису показали као добри антиоксиданси, испољили су хепатопротективни потенцијал у моделу CCl₄-узрокованих оштећења јетре, а само метил-*N*-метилантранилат нефропротективни потенцијал у истом моделу, код пацова. Оба алкалоида показала су значајну антиулцерозну активност, чак и у дози од 50 mg/kg т.м. Утврђена је њихова селективна инхибиторна активност према тестираним гљивицама. Анализом изопропил- и метил-*N*-метилантранилата, и њихових метаболита у урину и органима пацова третираних овим супстанцама, утврђено је да су у случају изопропил-*N*-метилантранилата доминантни метаболити настали хидроксилацијом ароматичног језгра, а у случају метил-*N*-метилантранилата производи хидролизе и амонолизе. Синтетисан је и метил-*N*-метил-*N*-нитрозоантранилат и проучавана је његова термичка разградња. Метил-5-метил-6-оксо-5*H*-фенантридин-4-карбоксилат је идентификован међу 46 производа термоллизе у кондензованој фази, а у парној фази су идентификовани само диметил-2,2'-(1,2-диметилхидразин-1,2-диил)добензоат и метил-*N*-метилантранилат.

У шестом и седмом поглављу (*Извод и Summary*) је дат преглед извршених испитивања и побројани су најважнији резултати и закључци дисертације.

ВРЕДНОВАЊЕ РЕЗУЛТАТА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ниво остваривања постављених циљева из пријаве докторске дисертације (до 200 речи)

Сви постављени циљеви ове докторске дисертације су остварени: извршена је детаљна анализа хемијског састава етарског уља биљне врсте *C. ternata*, одабрани састојаци етарског уља (изопропил- и метил-*N*-метилантранилат), као и њихов дериват (пропил-*N*-метилантранилат), синтетисани су и потпуно спектрално окарактерисани. Затим је за синтетисана једињења извршено испитивање антиоксидантне и антимикробне активности, акутне токсичности и низа фармаколошких активности (испитивање аналгетског дејства, утицаја на функције централног нервног система, хепато-, нефро- и гастропротективног дејства). Испитиван је и метаболизам и дистрибуција одабраних синтетисаних једињења у урину и органима пацова. Резултати тестирања фармаколошке активности синтетисаних једињења су, барем делимично, оправдали етнофармаколошку примену биљне врсте *C. ternata*. Поред тога, синтетисан је и метил-*N*-метил-*N*-нитрозоантранилат и проучавана је његова термичка разградња у парној и кондензованој фази.

Вредновање значаја и научног доприноса резултата дисертације (до 200 речи)

Резултати истраживања дати у докторској дисертацији кандидаткиње Ане Милтојевић представљају значајан и оригиналан допринос хемији природних производа, конкретно, испитивању секундарних метаболита биљне врсте *Choisya ternata*. Остварена је синтеза два протоалкалоида (изопропил- и метил-*N*-метилантранилат) присутна у етарском уљу ове биљне врсте. Притом, изопропил-*N*-метилантранилат (тернантранин) је по први пут детектован у живом свету. Проучавана је биолошка активност ових испарљивих естара *N*-метилантранилне киселине, као и метаболизма и дистрибуција у органима пацова. С обзиром да су оба антранилата испољила низ фармаколошких активности, оправдана је, барем делимично, етнофармаколошка примена ова биљне врсте. Тематика којом се бави дисертација Ане Милтојевић уклапа се у савремене трендове истраживања у свету, а због своје свеобухватности (хемијска анализа и синтеза) ова дисертација превазилази стандардне оквири једног фитохемијског истраживања. Треба још једном нагласити да су сви резултати дати у дисертацији нови и оригинални, а део тих резултата је већ објављен – 3 рада у врхунским (M21), 4 рада у истакнутим (M22) међународним часописима и 2 рада у водећем часопису националног значаја (M51).






Оцена самосталности научног рада кандидата (до 100 речи)

Кандидат је при изради ове докторске дисертације показао висок степен самосталности, како током експерименталног рада, где је морао да овлада различитим методама раздвајања, анализе и синтезе, тако и при интерпретацији добијених резултата. Такође, кандидат је показао да током научног рада може самостално да препозна проблеме и да пронађе адекватна решења.

ЗАКЉУЧАК (до 100 речи)

Имајући у виду актуелност обрађене проблематике и остварене научне резултате кандидата, чланови Комисије са задовољством предлажу Наставно-научном већу Природно-математичког факултета у Нишу, као и Научно-стручном већу за природно-математичке науке Универзитета у Нишу, да се докторска дисертација под насловом „Секундарни метаболити биљне врсте *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae): изоловање, синтеза, спектрална карактеризација и биолошка активност” прихвати и да се кандидату Ани Милтојевић, дипломираном хемичару, одобри њена усмена одбрана.

КОМИСИЈА

Број одлуке ННВ о именовану Комисије	220/1-01		
Датум именовања Комисије	24.02.2016. године		
Р. бр.	Име и презиме, звање		Потпис
1.	др Марина Стојановић, редовни професор	председник	
	Хемија, Хемијске опасности у радној и животној средини	Факултет заштите на раду у Нишу	
	(Научна област)	(Установа у којој је запослен)	
2.	др Стево Најман, редовни професор	члан	
	Биологија	Медицински факултет у Нишу	
	(Научна област)	(Установа у којој је запослен)	
3.	др Нико Радуловић, ванредни професор	ментор, члан	
	Хемија, органска хемија и биохемија	Природно-математички факултет у Нишу	
	(Научна област)	(Установа у којој је запослен)	
4.	др Полина Благојевић, ванредни професор	члан	
	Хемија, органска хемија и биохемија	Природно-математички факултет у Нишу	
	(Научна област)	(Установа у којој је запослен)	
5.	др Видослав Декић, доцент	члан	
	Хемија, органска хемија	Природно-математички факултет у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици	
	(Научна област)	(Установа у којој је запослен)	

Датум и место:

У Косовској Митровици и Нишу
31. 03. 2016. године