

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ -
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.03.2019. године, изабрани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Јоване М. Станковић, мастер хемичара, под насловом: „Халофитне биљне врсте – изоловање и карактеризација секундарних метаболита“

На основу прегледа дисертације, Наставно-научном већу подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Јоване Станковић мастер хемичара, под насловом „Халофитне биљне врсте – изоловање и карактеризација секундарних метаболита“ написана је на 178 страна текста и садржи 23 табеле и 161 слику. Дисертација обухвата следећа поглавља: ИЗВОД (3 стране), ИЗВОД на енглеском језику (3 стране), УВОД (1 страна), ОПШТИ ДЕО (38 страна), НАШИ РАДОВИ (100 страна), ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО (20 страна), ЗАКЉУЧАК (2 стране), ЛИТЕРАТУРА (15 страна, 163 цитата) и БИОГРАФИЈА (2 стране). Поред наведеног, рад садржи Захвалницу, Садржај, Списак симбола и скраћеница и Списак објављених радова који су проистекли из докторске дисертације.

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

У **ОПШТЕМ ДЕЛУ** дати су општи подаци везани за халофитне биљне врсте: подела, ареал и педолошке особине станишта која насељавају. Описани су специфични механизми адаптације на стрес узрокован повећаном концентрацијом соли као и употреба ових биљака у традиционалној медицини. Приказане су ботаничке карактеристике (морфологија, варијабилност и таксономија) фамилија *Amaranthaceae* и *Asteraceae*, родова: *Atriplex* и *Artemisia* као и испитиваних врста: *Atriplex littoralis*, *Atriplex tatarica*, *Atriplex prostrata* и *Artemisia santonicum*. Дат је преглед досадашњих истраживања са посебним

освртом на испитиване врсте као и значај и примена тих испитивања. Наведене су до сада познате компоненте биљака из рода *Atriplex* и етарских уља биљних врста *Artemisia*. У овом делу посебно су обрађени литературни подаци биолошких активности етарског уља изолованог из врсте *Artemisia santonicum*. На крају овог поглавља образложени су појмови везани за биолошке активности испитиване у овом раду. Укратко је описан механизам међућелијске комуникације (Quorum Sensing) и неки од вирулентних фактора грам негативне бактерије *Pseudomonas aeruginosa* (формирање биофилма, тестови покретљивости и продукција пигмента пиоцијанина).

У оквиру поглавља **НАШИ РАДОВИ** приказани су резултати који се односе на изолована чиста једињења из две *Atriplex* биљне врсте. Детаљно је описан поступак карактеризације три нова флавоноидна гликозида из биљне врсте *Atriplex littoralis*, једног новог флавоноидног гликозида и три тритерпенска сапонина из биљне врсте *Atriplex tatarica* применом спектроскопских (UV, IR, 1D и 2D NMR) и спектрометријских (HRESIMS) техника. Описана је примена комбинације високоефикасне танкослојне хроматографије и биоаутографије за одређивање биолошких активности фракција које су изоловане из биљне врсте *Atriplex prostrata*. Приказан је поступак одређивања хемијског састава етарског уља изолованог из биљне врсте *Artemisia santonicum* употребом GC/MS технике као и изоловање и одређивање структуре компоненте са најизраженијом биолошком активношћу. У последњем делу овог поглавља приказани су резултати различитих биолошких тестова на фракцијама, изолованим једињењима и етарском уљу.

У оквиру поглавља **ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО** дате су информације о инструментима и хемикалијама коришћеним током израде овог рада. Такође, приказане су и експерименталне процедуре које су коришћене током изоловања и испитивања биолошких активности фракција, једињења и етарског уља. Осим тога дати су подаци о биљном материјалу као и спектроскопски подаци за нова изолована једињења.

У **ЗАКЉУЧКУ** су сумирани најважнији резултати хемијских и биолошких испитивања изабраних халофитних врста. На крају као општи закључак резултати ове докторске дисертације указују да халофитне биљке представљају потенцијално нови извор биолошки активних једињења.

ЛИТЕРАТУРА (163 цитата) обухвата радове из области истраживања и покрива све делове дисертације.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У овој дисертацији приказани су поступци изоловања и пречишћавања секундарних метаболита две халофитне биљне врсте рода *Atriplex*, као и поступак изоловања и хемијски састав етарског уља које је изоловано из халофитне врсте *Artemisia santonicum*. Из халофитних биљних врста рода *Atriplex* изолована су два фенолна једињења, седам флавоноидних гликозида и три тритерпенска сапонина. Детаљно је описана њихова хемијска карактеризација употребом 1D (^1H и ^{13}C) и 2D (COSY, NOESY, ROESY, TOCSY, HSQC и HMBC) NMR техника, UV и IR спектроскопијом, масеном спектрометријом високе резолуције (HRESIMS) и полариметријом. Из халофитне биљне врсте *Atriplex prostrata* колонском хроматографијом на стубу Sephadex-а LH20 изоловане су фракције које су комбинацијом метода HPTLC и биоаутографије показале антибактеријски потенцијал ка врстама *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* и *Micrococcus flavus*. Сапонинске фракције су инхибирале раст све четири бактеријске врсте. За једињења која су изолована из врсте *Atriplex littoralis* испитан је и описан њихов протективни ефекат на ДНК хуманих лимфоцита. Прегледом литературе утврђено је да је овај тип биолошке активности по први пут испитиван у овом раду за једињења изолована из халофитних врста уопште. Најјачу превенцију (*in vitro*) биохемијских и цитогенетичких оштећења хуманих лимфоцита изазваних γ -зрачењем показао је нови флавоноидни гликозид атриплексин III. Из биљне врсте *Atriplex tatarica* изолован је нов дериват патулетина као и три нова тритерпенска сапонина, олеанолног типа. За ова једињења испитана је антибактеријска активност микродилуционом методом и утицај једињења на процес формирања биофилма бактерије *Pseudomonas aeruginosa*. Док су боље антибактеријске активности показали флавоноидни гликозиди, нови сапонини су имали израженију активност инхибиције формирања биофилма *P. aeruginosa*. Из халофитне биљне врсте *Artemisia santonicum* изоловано је етарско уље и одређен је хемијски састав. Применом високоефикасне танкослојне хроматографије у комбинацији са биоаутографијом утврђена је антимикуробна активност самог етарског уља као и најактивније компоненте. Употребом вишеструке „dry flash“ хроматографије као активна компонента изолована је изогеранилна киселина, након чега је потврђена њена јака антимикуробна активност, много боља од самог уља, и од комерцијалних антибиотика

стрептомицина и ампицилина, и антимицотика бифоназола и кетоконазола. Изогеранилна киселина је показала и значајну антибиофилм и „antiquorum sensing“ активност.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Претходна испитивања хемијског састава биљних врста рода *Atriplex* наведена у литератури као главне секундарне метаболите истичу флавоноиде, сапонине и алкалоиде. Међу флавоноидима карактеристични су агликони и деривати: нарингина, нарингенина, изорамнелина, патулетина, кверцетина, кемпферола и мирицетина. У оквиру ове дисертације по први пут су изоловани нови флавоноидни деривати кверцетагетинског типа, атриплексин I, атриплексин II и атриплексин III. Из врсте *A. littoralis*, и по први пут су из биљне врсте *A. tatarica* изоловани један нов флавоноидни дериват патулетинског типа, атриплексин IV, и два позната флавоноидна деривата патулетинског типа (раније изоловани из врста *A. littoralis* и *Spinacia oleracea*).

Према литературним подацима из врста рода *Atriplex* изоловани су пентациклични тритерпенски сапонини најчешће олеананског типа: деривати саикогенина, лонгиспиногенина и хедерагенина. Исто тако описани су и олеанански сулфатни деривати, изоловани из врсте *A. glauca*, ретки сулфатни деривати сапонина. У овом истраживању су изолована два нова пентациклична тритерпенска сулфатна деривата олеанолног типа као и један нов несулфонован сапонин истог типа.

Претходна истраживања патулетина и његових деривата су показала да овај тип флавоноида има антиоксидативну, антиинфламаторну, антипролиферативну активност и хепатопротективну активност, а бидесмозидични пентациклични тритерпени антиинфламаторну, цитотоксичну и антимицробну активност.

У оквиру овог истраживања за флавоноиде кверцетагетинског типа је по први пут испитана протективна активност на ДНК хуманих лимфоцита, а за патулетинске флавоноидне деривате антибактеријска активност и по први пут је испитан њихов утицај на процес формирања биофилма бактерије *Pseudomonas aeruginosa*.

До сада је објављено само неколико радова о цитотоксичној, молусцицидалној, антиоксидативној и антибактеријској активности пентацикличних тритерпенских сапонина олеанолног типа који су изоловани из биљних врста рода *Atriplex*. Једињења овог типа изолована из других нехалофитних биљних врста (*Cephalaria scoparia*, *Paullinia*

pinnata, *Burkea Africana Medicago*) показала су антибактеријску, антифунгалну, антивиралну, инсектицидну, алелопатску и цитотоскичну активност. У оквиру ове тезе истраживање је било усмерено и на испитивање утицаја једињења на процес формирања биофилма бактерије *Pseudomonas aeruginosa*, зато што у литератури о овој врсти антибактеријске активности за пентацикличне тритерпене изоловане из рода *Atriplex* није било података.

У досадашњим испитивањима хемијског састава етарског уља *A. santonicum* као главне компоненте у литератури наведене су: камфор (18,18%), 1,8-цинеол (7,53%), борнеол (4,02%), α -терпинеол (4,07%), терпинен-4-ол (3,47%) (*A. santonicum* из Турске); α -тујон (44,8%) (*A. santonicum* из Румуније); α -тујон (39,46%), β -тујон (25,14%), 1,8-цинеол (6,65%), камфор (1,95%) (*A. santonicum* друго уље из Турске); камфор (20,11%), *цис*-вербенол (19,85%) и 1,8-цинеол (18,26%) (*A. santonicum* друго уље из Румуније). У нашем истраживању најзаступљенија једињења била су 1,8-цинеол (18,8%), хризантенон (13,3%), *цис*-тујон (8,4%), *транс*-сабиниол ацетат (3,3%) и камфор (3,3%) (*A. santonicum*, из Србије) и показало је сличност у саставу са оба уља из Турске и другим из Румуније пошто су 1,8-цинеол и камфор међу најзаступљенијим компонентама, али и значајне разлике јер се први пут помиње као главна компонента хризантенон и то у високом проценту од 13,3%.

У досадашњим испитивањима биолошких активности етарских уља *Artemisia* врста, изолована уља су показала антиоксидативну, антифунгалну, антибактеријску и антихелминтску активност. Идеју за испитивање уља халофитне врсте *Artemisia santonicum* дао је преглед литературе којим је утврђено да је ова врста показала највећи антибактеријски потенцијал од свих етарских уља *Artemisia* врста. Поред одређивања антибактеријске и антифунгалне активности етарског уља *A. santonicum*, ово истраживање је проширено на испитивање антибиофилм и „anti-quorum” активности уља. До сада у литератури нема података за ове типове активности етарског уља *A. santonicum*. Одређивање антимикробне активности етарског уља *A. santonicum* рађено је микродилуционом и биоаутографском методом. Метода биоаутографије која је комбинована са високоефикасном танкослојном хроматографијом послужила је за одређивање активности биоактивних (антибактеријских) компоненти. Након ове анализе утврђено је да је најактивнија компонента изогеранилна киселина, која је присутна у уљу у малом проценту - 0,2% и која је показала ефекте на све тестиране механизме укључене у

испитивању „anti-quorum sensing” активности. У литератури нема података о изогеранилној киселини као компоненти етарског уља *A. santonicum* као ни резултата о испитивању утицаја етарског уља *A. santonicum* на формирање биофилма бактерије *P. aeruginosa*, о тестовима покретљивости („twitching“ и „flagella test“) и о утицају на инхибицију синтезе пиоцијанина код *P. aeruginosa*.

Г. Објављени и саопштени радови који чине део дисертације

Део резултата ове докторске дисертације објављен у међународном часопису изузетних вредности (1 рад M21a), врхунском међународном часопису (1 рад M21), поглављу у књизи (1 рад M14) и саопштен на међународном скупу, штампан у изводу (M34).

Рад у међународном часопису изузетних вредности (M21a):

1. **Jovana Stanković**, Dejan Gođevac, Vele Tešević, Zora Dajić-Stevanović, Ana Cirić, Marina Soković, Miroslav Novaković. (2019) Antibacterial and Antibiofilm Activity of Flavonoid and Saponin Derivatives from *Atriplex tatarica* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 82(6), 1487-1495. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.8b00970> (IF 4,257)

Рад у врхунском међународном часопису (M21):

1. Dejan Gođevac, **Jovana Stanković**, Miroslav Novaković, Boban Anđelković, Zora Dajić-Stevanović, Milica Petrović; Miroslava Stanković. (2015) Phenolic compounds from *Atriplex littoralis* and their radiation-mitigating activity. *Journal of Natural Products* 78(9), 2198-2204. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.5b00273> (IF 3,662)

Поглавље у монографији међународног значаја (M14):

1. Zora Dajić-Stevanović, Milan Stanković, **Jovana Stanković**, Peđa Janačković, Miroslava Stanković (2019) Use of halophytes as medicinal plants: Phytochemical diversity and biological activity. In: Hasanuzzaman M., Shabala S., Fujita M. (Eds) *Halophytes and Climate Change: Adaptive Mechanisms and Potential Uses*. CABI, Boston, USA, pp. 343-368. <https://doi/10.1079/9781786394330.0343>

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34):

1. Dejan Gođevac, **Jovana Stanković**, Boban Anđelković, Milka Jadranin, Milica Petrović, Vlatka Vajs, Slobodan Milosavljević, Zora Dajić Stevanović. New Flavonoids from *Atriplex littoralis* L. International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf (INCPU), 3-6 November 2013, Bansko, Bulgaria, Book of Abstracts, PP40.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације 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 количина подударња текста износи 19%. 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 претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. овог правилника.

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

Ђ. Закључак

Комисија сматра да докторска дисертација „Халофитне биљне врсте – изоловање и карактеризација секундарних метаболита“ кандидаткиње Јоване М. Станковић, мастер хемичара, представља научно вредан допринос у познавању састава секундарних метаболита домаћих халофитних биљних врста. Комисија је такође закључила да је кандидаткиња успешно остварила све задате циљеве. Применом спектроскопских и спектрометријских метода изоловала је и окарактерисала, укупно 13 секундарних метаболита из биљних врста које насељавају заслањена станишта, од којих је 7 нових природних производа. Од познатих секундарних метаболита два су по први пут изолована из испитиваних врста. Одредила је биолошку активност појединих фракција и чистих једињења. Већина тестова биолошких активности испитаних у овој тези је по први пут примењена на чиста једињења врста родова *Atriplex* и *Artemisia*.

Постигнути резултати су објављени у једном научном раду у међународном часопису изузетних вредности (M21a) и једном научном раду у врхунском међународном часопису (M21). Такође, кандидаткиња је коаутор једног поглавља у књизи (M14) и једног саопштења са међународног скупа штампаног у изводу (M34).

На основу свега наведеног Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да прихвати овај реферат и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

Београд, 08.08.2019.

Чланови комисије:

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

др Мирослав Новаковић, научни сарадник (ментор)
Научна установа Институт за хемију, технологију и металургију
Институт од националног значаја, Универзитет у Београду

др Дејан Гођевац, научни саветник
Научна установа Институт за хемију, технологију и металургију
Институт од националног значаја, Универзитет у Београду

др Љубодраг Вујисић, доцент
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Зора Дајић Стевановић, редовни професор
Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет