

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

ШИБУЛ ФИЛИПА

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију 05.10.2017. год., Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са знаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>1) др Неда Мимица-Дукић, редовни професор, уже научна област Биохемија, изабрана у звање 01.08.2003. године, Природно-математички факултет, председник;</p> <p>2) др Дејан Орчић, ванредни професор, уже научна област Биохемија, изабран у звање 03.03.2016. године, Природно-математички факултет, ментор;</p> <p>3) др Мирјана Попсавин, редовни професор, уже научна област Органска хемија, изабрана у звање: 01. 01. 2003. године, Природно-математички факултет у Новом Саду, члан;</p> <p>4) др Емилија Свирчев, доцент, уже научна област Биохемија, изабрана у звање 15.04.2015. године, Природно-математички факултет, члан;</p> <p>5) др Драгана Четојевић-Симин, научни саветник, уже научна област Биотехнологија, изабрана у звање: 28. 01. 2016. године, Институт за онкологију Војводине, члан.</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Филип, Станко, Шибул</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 01.02.1989., Кикинда, Република Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Природно-математички факултет, Мастер академске студије биохемије, Мастер биохемичар</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2012. године, Докторске академске студије биохемије</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
<p>„Isolation, chemical characterisation and biological activity of acylphloroglucinols from petroleum ether extract of <i>Hypericum barbatum</i> Jacq. 1775 (Izolacija, hemijska karakterizacija i biološka aktivnost acilfloroglucinola iz petrolearskog ekstrakta <i>Hypericum barbatum</i> Jacq. 1775)“</p>

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У докторској дисертацији Шибул Филипа описано је изоловање осамнаест нових једињења – пренилованих ацифлороглуцинола са ендопероксидним мостом, означених као хиперибарбини А–Р (по абecedном реду) – из петролетарског екстракта биљке *Hypericum barbatum* Jacq. 1775 сакупљене у Црној Гори. Структура свих изолованих једињења, укључујући стереохемију, расветљена је спектрометријским методама. За једињења која су изолована у већим количинама испитана је и биолошка активност. Показано је да хиперибарбини имају умерену цитотоксичну активност али уз ниску селективност. Упркос присуству ендопероксидног моста, ова једињења нису показала значајну антипаразитску (антималаријску) активност. Хиперибарбини нису деловали на Грам негативне бактерије, али је демонстрирана активност према Грам позитивним бактеријама упоредива са антибиотцима. Дисертација је написана на енглеском језику уз проширени сажетак на српском, број страна је 377, подељених у 5 поглавља: општи део – Introduction (46); експериментални део – Material and Methods (17); резултати – Results (280); закључак – Concluding Remarks (2); и референце – References (30). Докторска дисертација садржи 406 слика и 50 табела. У овој дисертацији цитирано је 240 научних референци.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У уводу ове докторске дисертације, истакнут је значај једињења из групе ацилфлороглуцинола из *Hypericum* врста. У општем делу (поглавље Introduction, 46 страна) описане су ботаничке карактеристике и хемијски састав биљне врсте *Hypericum barbatum* Jacq. 1775 која је коришћена као материјал у овом истраживању. Посебно је описан значај изоловања нових ацилфлороглуцинола, као потенцијалних фитотерапеутика у третману широког спектра обољења. Дат је детаљан опис хемијских карактеристика једињења из класе флороглуцинола изолованих из *Hypericum* врста и описане су њихове биолошке активности, односно антиоксидативни, антиинфламаторни, антидепресантни, антибактериолошки и антипролиферативни, односно цитотоксични потенцијал, поткрепљени цитатима најновијих истраживања у овој области. Циљеви истраживања обухваћени овом докторском дисертацијом су јасно и прецизно дефинисани.

У експерименталном делу (поглавље Material and Methods, 17 страна), детаљно су описани сви поступци припреме и екстракције биљног материјала, као и кораци у фракционисању петролетарског екстракта. Све технике коришћене за фракционисање, укључујући адсорпциону хроматографију, центрифугалну партициону хроматографију и препаративну течну хроматографију високих перформанси, детаљно су описане. Са циљем потпуне карактеризације изолованих једињења, приказани су сви параметри коришћених спектроскопских техника (NMR спектроскопија, MS спектрометрија, UV/Vis спектроскопија, полариметрија, CD спектрополариметрија). Такође су детаљно описане методе испитивања биолошке активности – антипролиферативна, антибактеријска и антипаразитска активност.

У резултатима (поглавље Results, 280 страна) је поступно описан поступак фракционисања и изолације једињења са дискутовањем предузетих корака и објашњењем свих коришћених поступака. Врло детаљно описана је потпуна хемијска карактеризација осамнаест изолованих једињења – хиперибарбина А до Р (по абecedном реду). За свако од изолованих једињења, извршена је дискусија снимљених NMR спектра (^1H , ^{13}C , HSQC, COSY, HMBC, NOESY), на основу којих је, помоћу тоталне асигнације, утврђена структура и релативна конфигурација сваког од њих. Анализом фрагментација њихових структура у току MS/MS експеримената, као и тумачењем симулација спектра циркуларног дихроизма, утврђене су и апсолутне конфигурације сваког од изолованих једињења. Приказани су и детаљно продискутовани резултати испитивања цитотоксичности, антибактеријске и антипаразитске активности за четири одабрана једињења.

На крају, у закључку (поглавље Concluding remarks, 2 стране) су јасно и прегледно, логички и концизно сумирљни резултати ове докторске дисертације који недвосмислено указују на научни допринос резултата истраживања обухваћених овом докторском дисертацијом, посебно са аспекта оригиналности и актуелности теме истраживања.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Šibul, F., Orčić, D., Svirčev, E., Mimica-Dukić, N. (2016) Optimization of extraction conditions for secondary biomolecules from various plant species. *Hem. Ind.* **70**(4): 473–483. (M23)

VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Реализацијом ове докторске дисертације, остварени су постављени циљеви, у првом реду изоловање нових, до сада необјављених, једињења. Сукцесивним фракционисањем петролетарског екстракта трепљастиг кантариона (*Hypericum barbatum* Jacq. 1775), уз коришћење више техника раздвајања и пречишћавања, издвојене су фракције које су указивале на потенцијално присуство ацилфлороглуцинола. Њихово присуство детектовано је уз помоћ танкослојне хроматографије, као и уз помоћ нуклеарне магнетне резонанце. Специфични пикови у протонском NMR спектру су указивали на евентуално присуство жељених једињења. Из интересантних фракција, једињења су даље изолована уз помоћ препаративних техника, у првом реду семипрепаративном течном хроматографијом високих перформанси и центрифугалном партиционом хроматографијом.

У првој фази рада, петролетарски екстракт је одмашћен колонском хроматографијом са испуном на бази стирен-дивинилбензена. Након тога, одмашћене фракције су даље подвргнуте серији фракционисања уз помоћ адсорпционе (флеш) хроматографије и центрифугалне партиционе хроматографије. Комбинацијом две течних хроматографске технике омогућена је висока селективност поступка фракционисања, односно постигнуто је такво раздвајање, помоћу кога је било могуће лако детектовати фракције које садрже ацилфлороглуциноле.

Из фракција од интереса, изоловано је осамнаест једињења из групе ацилфлороглуцинола, за које је потврђено да су нова, до сада необјављена. Из фракције PE-1.2.3.2, изолована су четири нова једињења, која су названа хиперибарбин А, Б, Ц и Д. Хиперибарбини А и Б су диастереоизомерна једињења, односно епимери на С-3 атому, као што су то и хиперибарбини Ц и Д. Уз то, хиперибарбини Ц и Д имају једну метиленску функционалну групу више у својој структури, у односу на једињења А и Б. Сва четири једињења у својој структури поседују ендопероксидну функцију – ендопероксидни мост између атома С-4 и С-6. Осим у наведеној фракцији, ова четири једињења су такође изолована из још неколико различитих фракција, те је њихов коначни принос масе био значајан (између 30 и 60 mg). Овакав принос омогућио је тестирање биолошке активности поменутих једињења, те су она тестирана против туморских ћелија, као и против Грам позитивних и Грам негативних бактеријских сојева.

Препаративном анализом фракције PE-1.2.3.3 изоловано је осам нових једињења, названих хиперибарбини Е–Л (абecedним редом). Ова једињења су слична претходним, јер свих дванаест садржи ендопероксидну функционалну групу на истој позицији у структури. Такође, хиперибарбини И до Л имају једну метиленску функцију више у односу на хиперибарбине Е до Х. Осим тога, у односу на хиперибарбине А–Д, ових осам једињења имају један додатни шесточлани прстен у својим структурама, настао циклизацијом једног од пренил бочних низова.

Хиперибарбини М, Н, О, П, Q и R су шест једињења изолованих из фракције PE-1.3.6. Ова једињења такође имају ендопероксидни мост у својој структури, али између С-2 и С-4 атома. Осим тога, по остатку структуре, као и по молекулској маси, хиперибарбини М до П су еквивалентни онима од Е до Х, док исто важи за однос хиперибарбина Q и R са

хиперибарбинима И–Л.

При тестирању цитотоксичности, сви хиперибарбини (А, Б, Ц и Д) су испољили умерену активност према испитаним хуманим ћелијским линијама, са IC_{50} вредностима у опсегу од 9.22–17.0 μM према ћелијама хепатоцелуларног карцинома (Hep G2), 12.8–21.8 μM према ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), 14.4–27.8 μM према ћелијама аденокарцинома простате (PC-3), а били су најмање активни према ћелијама карцинома плућа (A549), са IC_{50} вредностима у опсегу од 20.2–27.1 μM . Међутим, четири испитана једињења су испољила инхибиторно дејство и према здравим феталним ћелијама плућа (MRC-5), са IC_{50} вредностима у опсегу од 13.4–20.4 μM , испољавајући неселективни тип цитотоксичности.

Наведена четири једињења су била неактивна према Грам негативним бактеријама, док су према Грам позитивним бактеријама сојева *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Lysteria monocytogenes* испољили значајну активност, са минималним инхибиторним концентрацијама упоредивим са конвенционалним антибактеријским лековима. Овакав вид деловања је био очекиван, с обзиром да постоје литературни подаци о једињењима сличне структуре која имају јако антибактеријско деловање.

Присуство ендопероксидне функционалне групе у свим изолованим једињењима може се упоредити са активним делом структуре артемизинина, једињења чије откриће је резултовало Нобеловом наградом за медицину или физиологију 2015. године. С обзиром на то, испитана је и антипаразитска, односно антипротозоална активност једињења. Узимајући њихову структурну разноликост у обзир, хиперибарбини Ц, Е, К и Н су одабрани за ову анализу. Међутим, испитана четири једињења су показала само умерену активност према испитаним паразитским организмима (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense* и *Leishmania donovani*), са ниским терапеутским индексима селективности.

Закључци формулисани у дисертацији су логично изведени из добијених резултата и јасно одражавају значај и научни допринос спроведеног истраживања.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Кандидат Филип Шибул је спровео истраживања у складу са планом датим у пријави теме докторске дисертације. Веоме је студиозно и поступно приступио обради и анализи великог броја експерименталних података који су успешно систематизовани у логичке целине. Текст ове докторске дисертације на јасан и разумљив начин описује тему истраживања и приказује резултате рада са свим неопходним техничким и теоријским детаљима. Резултати истраживања су презентовани систематично, свеобухватно и јасно у виду слика, табела и дискусије. Успешно су примењене савремене препаративне методе и технике раздвајања, а кандидат је показао и добро познавање и разумевање спектроскопских техника за хемијску карактеризацију молекула. Кроз приказ и интерпретацију резултата биолошких испитивања, кандидат је показао добро познавање ове материје и способност за интердисциплинарни рад, повезивање и истицање важних резултата сложене проблематике.

Комисија позитивно оцењује начин приказа резултата, дискусију и тумачење резултата, као и извођење закључака који дају јасне одговоре на задатке и циљеве постављене у пријави ове докторске дисертације.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме
Да, Комисија оцењује да је докторска дисертација урађена и написана у потпуности у складу са образложењима наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе
Да, дисертација садржи све битне елементе – дефинисање теме истраживања, преглед постојећих актуелних истраживања, јасан, детаљан и прегледан приказ експерименталних резултата и њихову дискусију, списак литературе и закључак.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци
Комисија сматра да ова докторска дисертација има све битне елементе оригиналног научног рада, чији се оригиналан научни допринос науци у првом реду огледа кроз изолацију осамнаест нових, до сада неописаних једињења из класе ацилфлороглуцинола. Поред тога, резултати ове докторске дисертације пружају нова сазнања о хемијском саставу и биолошким активностима до сада недовољно хемијски и биолошки испитане биљне врсте *Hypericum barbatum* Jacq. 1775. Резултати ове дисертације дали су детаљан увид у процес фракционисања петролетарског екстракта одабраног узорка и исцрпно приказали све кораке који су водили изолацији нових једињења. Ова сазнања су од велике важности за будуће изолације једињења сличне структуре, нарочито ацилфлороглуцинола, који имају веома широк спектар биолошких и фармаколошких активности и као такви представљају потенцијалне сировине за фармацевтску индустрију. Једињења изолована у оквиру ове докторске дисертације су такође испитана на антипролиферативну, антибактеријску и антипаразитску активност. Њихова изузетна бактериостатска активност према Грам позитивним бактеријама указује на њихов велики значај као потенцијалних антибактеријских агенаса.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања
Комисија је мишљења да ова докторска дисертација на садржи недостатке.

X ПРЕДЛОГ:

На основу свега наведеног, Комисија предлаже да се прихвати позитивна оцена докторске дисертације под насловом: „Isolation, chemical characterisation and biological activity of acylphloroglucinols from petroleum ether extract of *Hypericum barbatum* Jacq. 1775 (Izolacija, hemijska karakterizacija i biološka aktivnost acilfloroglucinola iz petroletarskog ekstrakta *Hypericum barbatum* Jacq. 1775)“, а кандидату Шибул Филипу одобри одбрана докторске дисертације.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Неда Мимица-Дукић, редовни
професор, председник комисије

др Дејан Орчић, ванредни професор,
ментор

др Мирјана Попсавин, редовни професор,
члан

др Емилија Свирчев, доцент, члан

др Драгана Четојевић-Симин, научни
саветник, члан

у Новом Саду, 25.10.2017. године