

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидата Стефана Лекића, мастер хемичара, пријављене под насловом „**Метаболомика биљака за откривање биомаркера хемијске изложености хлору**“.

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Органска хемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације је одређивање маркера изложености биљака ниским концентрацијама хлора (испод 50 ppm) применом метаболомичког приступа. Као модел системи изабране су две космополитске биљне врсте: *Arabidopsis thaliana* (скупљен) и *Plantago lanceolata* (усколисна боквица).

Метаболомички профили третираних и нетретираних биљака ће се добити применом различитих инструменталних техника: нуклеарном магнетном резонантном (NMR) спектроскопијом, инфрацрвеном спектроскопијом (IR), видљивом и блиском инфрацрвеном спектроскопијом листова (leaf spectrometry) и масеном спектрометријом у комбинацијама са гасном хроматографијом (GC/MS) и течном хроматографијом (LC/MS).

Овако добијени подаци омогућиће поређење метаболичких профила третираних и нетретираних биљака применом метода мултиваријантне анализе. То подразумева примену несупервизираних методе - анализе главних компоненти (PCA), као и супервизираних метода заснованих на парцијалној регресији најмањих квадрата (OPLS, OPLS-DA). Као резултат мултиваријантне анализе биће идентификовани сигнали маркера изложености биљака хлором. Оквирне структуре маркера изложености биће одређени темељном анализом спектралних (1D и 2D NMR) и спектроскопских (GC/MS и LC/MS) података.

Екстракти третираних биљака биће подвргнути циљаном пречишћавању и изоловању детектованих маркера хроматографским техникама. У циљу потпуне карактеризације изолованих маркера изложености биће коришћене 1D и 2D NMR, GC/MS, LC/MS и IR инструменталне технике.

3. Основне хипотезе

Иако је хлор је токсичан гас, он се ипак не регулише међународном Конвенцијом о забрани хемијског оружја, пре свега због његове велике и разноврсне индустријске примене, то јест доступности. Ово никако не значи да је злоупотреба хлора дозвољена Конвенцијом. Такође смо сведоци више индустријских инцидената где су цистерне напуњене хлором (услед немара или нестручног руковања) изазвале велике катастрофе.¹ С друге стране, употребу хлора није тако лако доказати, јер не постоје довољно специфични маркери који би недвосмислено потврдили употребу овог токсичног гаса. У литератури је описано неколико експеримената дејства хлора на биолошке системе^{2,3,4} при чему је најчешће долазило до излагања различитог биолошког материјала дејству хлора и онда детектовању хлорованих једињења насталих након ензимске дигестије помоћу масене спектрометрије повезане са течном хроматографијом.⁴ Две космополитске биљне врсте (*Arabidopsis thaliana* и *Plantago lanceolata*) биће искоришћене као потенијално нову врсту биосензора за детекцију изложености хлором, али за разлику од осталих студија искористићемо метаболомички приступ тако да направимо јасну класификацију која једињења доприносе разликовању између контролне групе (нетретираних биљака) и третираних биљака. Обе групе биљака морају бити гајене под истим условима, а једина разлика ће бити третман хлором. Након припреме узорак и снимања IR и NMR спектра, као и GC/MS и LC/MS хроматограма следиће обрада добијених резултата која ће послужити као улазни сет података за мултиваријантну анализу. Мултиваријантна анализа ће омогућити профилисање свих узорака обе биљне врсте, а онда и класификовање (разликовање) третираних од нетретираних биолошких реплика. Добијени мултиваријантни класификациони модели се морају додатно валидирати како би се потврдила веродостојност добијених корелација и олакшало проналажење биомаркера насталих након изложености биљака хлором.

P. lanceolata је биљна врста богата секундарним метаболитима, пре свега иридоидним гликозидима као што су аукубин, каталпол и асперулозид, као и флавоноидима и различитим фенолним једињењима, укључујући вербаскозид, хесперидин и хиперозид. С обзиром на овај хемијски састав, може се очекивати да ће у условима хлоровања доћи до модификације, односно хлоровања наведених једињења.⁶

A. thaliana је такође богата флавоноидима и фенилпропаноидима, попут синапоил-малата и скополина, као и дериватима триптофана и метионина, па се може очекивати да ће током процеса хлоровања доћи до модификација ових група једињења.⁷

Након идентификације једињења која су одговорна за разликовање контролних од третираних биљака уследиће њихово изоловање из биљног материјала.

Спектроскопијом специјализованом за лист биљака могуће је снимити спектре у видљивој и блиској инфрацрвеној области, без нарушавања здравља листа. На основу тога што у експериментима хемијског стреса узрокованог хлором листови биљака губе своју боју/функцију (хлороза листа) да се претпоставити да ће се десити промена у садржају биљних пигмената између испитиваних група биљака. Те разлике би се могле уочити и праћењем неких од инкорпорираних биљних индекса (нпр. NDVI, SPAD...) али и доћи и до потенцијално новог биљног индекса који би био карактеристичан за случајеве изложености хлором.

4. Циљеви истраживања и очекивани резултати

Циљ истраживања ове докторске дисертације је проналажење потенцијалних биомаркера насталих излагањем биљака хлором метаболомичким приступом. Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су инспирисана и потенцијалном злоупотребом хлора као токсичне супстанце и могућим инцидентима у оквиру различитих грана индустрије где се хлор примењује, али и непостојањем потпуно окарактерисаних маркера његове примене. Две космополитске биљне врсте *A. thaliana* и *P. lanceolata*, гајене у контролисаним лабораторијским условима, послужиће као одвојени модел-системи за проналажење универзалних биомаркера у експериментима хемијског стреса хлором, док ће праћење метаболомичких профила третираних биљака у различитим фазама развоја и са различитим временским интервалима од третмана, омогућити већу примену ових биљних врста у хемијској форензици. Очекујемо да резултати ових истраживања допринесу не само детектовању примене хлора, већ и у одређивању протеклог времена од нежељеног догађаја.

Упоредо са одређивањем биомаркера комбинацијом припреме узорака, софистицираним инструменталним техникама и метаболомичким приступом у оквиру ове докторске дисертације биће коришћена и недеструктивна спектроскопија листа (у видљивој и блиској инфрацрвеној области 350-1100 nm) на третираним и нетретираним биљкама. За очекивати је да се у овим истраживањима одреди и индекс изложености хлором код биљака у циљу брзе детекције током теренских анализа, али и као добра основа за даљу примену добијених индекса у обради података са спектралних камера и снимака из ваздуха.

5. Методе истраживања – анализе материјала

Гајење биљака ће се спроводити у контролисаним условима CIA p-LAB вертикалне баште на Хемијском факултету у Београду. LED осветљење широког дневног спектра (400-800 nm) биће коришћено у режиму дугог дана (16 часова дан, 8 часова ноћ), за прихрану супстрата ће се користити комерцијални модификовани Хогландов раствор (Ferticare, Yara, Белгија). Током раста биљака основна морфолошка мерења ће обухватати мерење површине листа и мерење свеже биомасе у циљу постизања што боље репрезентативности одабраних листова/биљака.

Експерименти хемијског стреса (третирање биљака гасовитим хлором у концентрацијама мањим од 50 ppm) биће обављени у строго контролисаним условима (затвореним системима) на Универзитету у Београду – Хемијском факултету, придржавајући се свих безбедносних мера, пре свега деконтаминације неизреагованих количина хлора, док ће експерименти бити дизајнирани у складу са принципима зелене хемије.

Биљни метаболизам ће се квенчовати течним азотом, а непосредно након чега ће се биљни материјал самлети, а након тога и лиофилизовати (Martin Christ 2-4 Plus). Након лиофилизације узорци ће бити чувани на температури од -80 °C. Екстракције лиофилизованог биљног материјала ће се разликовати на основу технике која ће се касније користити у метаболомичком приступу. За припрему екстракта од појединачних биолошких реплика користиће се лиофилизованог материјала.

За припрему узорака за NMR спектроскопију користиће се смеше CD₃OD и KH₂PO₄ пуфера у D₂O, са додатком TSP-d₄ као интерног стандарда. Након чега ће се узорци екстраховати у ултразвучном купатилу, а потом центрифугирати. Добијени супернатант биће употребљен за све NMR експерименте.

За припрему за FTIR, GC/MS и LC/MS лиофилизованог материјала ће се екстраховати смешом метанол : вода са 2-деоксирибозом као интерним стандардом. Након екстракције на ултразвуку и центрифугирања супернатант ће се искористити за LC/MS, GC/MS и FTIR анализе. За LC/MS анализе није потребна даља припрема, док ће узорци за GC/MS и FTIR анализе бити упарене до сува на вакуум концентратору (Martin Christ RVC 2-18). FTIR спектри ће бити снимљени ATR техником у области (400-4000 cm⁻¹). Након упаравања до сува неопходно је да се обави двостепена дериватизација пре GC/MS анализе. Прва реакција дериватизације се изводи помоћу метоксиамин-хидрохлорода у пиридину, док следећи корак представља реакцију силанизовања помоћу BSTFA.

Припрема узорака за недеструктивну анализу (спектроскопија листова) није потребна. Спектрофотометар BioScience Leaf spectrometer CID 710S ће се користити за снимање спектра у сва три мода (апсорпција, трансмисија и рефлексија) у опсегу 350-1100 nm.

Све поменуте инструменталне технике ће бити искоришћене као улазни подаци за мултиваријантну анализу, чији резултати би требало да омогуће детекцију карактеристичних сигнала, које би на крају довеле до идентификације потенцијалних биомаркера хемијског стреса код биљака третираних хлором. То подразумева примену несупервизираних метода - анализе главних компоненти (PCA), као и супервизираних метода заснованих на парцијалној регресији најмањих квадрата (OPLS, OPLS-DA) у програмском пакету SIMCA, али и коришћењем програмског језика R као комплементарног начина за обраду података.

Након идентификације карактеристичних сигнала/хроматографских пикова приступиће се изоловању потенцијалних биомаркера и њиховој комплетној хемијској карактеризацији.

Додатно у односу на одређивање и карактеризацију биолошких маркера недесетруктивна спектрофотометријска метода ће бити искоришћена за одређивање познатих индекса код зелених биљака (нпр. NDVI, SPAD...) утврђивање да ли постоји правилна зависност тих индекса од количине стреса изазваног хлором и/или одређивање нових индекса који би били карактеристични за тровање биљака хлором.

6. Литература

1. Govier, P., & Coulson, J. M. (2018). Civilian exposure to chlorine gas: A systematic review. *Toxicology Letters*, 293, 249–252.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.014>
2. de Bruin-Hoegée, M., van Damme, I. M., van Groningen, T., van der Riet-Van Oeveren, D., Noort, D., & van Asten, A. C. (2022). Elucidation of in Vitro Chlorinated Tyrosine Adducts in Blood Plasma as Selective Biomarkers of Chlorine Exposure. *Chemical Research in Toxicology*, 35(6), 1070–1079.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00053>
3. Martz, S. v., Wittwer, M., Tan-Lin, C. W., Bochet, C. G., Brackmann, M., & Curty, C. (2022). Influence of Chlorinating Agents on the Formation of Stable Biomarkers in Hair for the Retrospective Verification of Exposure. *Analytical Chemistry*, 94(48), 16579–16586.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01867>

4. de Bruin-Hoegée, M., van der Schans, M. J., Langenberg, J. P., & van Asten, A. C. (2024). Biomarker profiling in plants to distinguish between exposure to chlorine gas and bleach using LC-HRMS/MS and chemometrics. *Forensic Science International*, 358.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112022>
5. Bahadori, M. B., Sarikurkcu, C., Kocak, M. S., Calapoglu, M., Uren, M. C., & Ceylan, O. (2020). *Plantago lanceolata* as a source of health-beneficial phytochemicals: Phenolics profile and antioxidant capacity. *Food Bioscience*, 34.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100536>
6. D'Auria, J. C., & Gershenzon, J. (2005). The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: Growing like a weed. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 8, Issue 3 SPEC. ISS., pp. 308–316). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.012>