

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

СЕКУНДАРНИ БИОМОЛЕКУЛИ У ВРСТАМА *ALLIUM SECT. CODONOPRASUM* RCHV. –
БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ, ФИТОХЕМИЈСКИ И ХЕМОТАКСОНОМСКИ АСПЕКТИ

кандидата мр Наташе Симин

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1. Датум и орган који је именовео комисију: Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду на својој XXVII седници одржаној 16.10.2014. године именовало је комисију за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата мр Наташе Симин под насловом „СЕКУНДАРНИ БИОМОЛЕКУЛИ У ВРСТАМА <i>ALLIUM SECT. CODONOPRASUM</i> RCHV. – БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ, ФИТОХЕМИЈСКИ И ХЕМОТАКСОНОМСКИ АСПЕКТИ“
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: 1. др Мирјана Попсавин, редовни професор, уже научна област органска хемија, изабрана у звање 01.03.2003. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, председник 2. др Неда Мимица-Дукић, редовни професор, уже научна област биохемија, изабрана у звање 01.08.2003. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, ментор 3. др Горан Аначков, доцент, уже научна област ботаника, изабран у звање 23.11.2009. године, Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду, члан 4. др Биљана Божин, ванредни професор, уже научна област фармакогнозија са фитотерапијом, изабрана у звање 08.10.2014. године, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду, члан 5. др Драгана Четојевић-Симин, научни сарадник, научна област биологија, изабрана у звање 07.07.2010. године, Институт за онкологију Војводине, Сремска Каменица, члан 6. др Драгана Митић-Ђулафић, научни сарадник, уже научна област молекуларна генетика, изабрана у звање 27.01.2011. године, Биолошки факултет у Београду, члан
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1. Име, име једног родитеља, презиме: Наташа, Ђорђе, Симин, 2. Датум рођења, општина, држава: 24.11.1975., Нови Сад, Република Србија 3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија - мастер и стечени стручни назив: Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду, смер дипломирани хемичар, стечени стручни назив – дипломирани хемичар 4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: / 5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду, „Биохемијска испитивања антиоксидантних активности у одабраним врстама рода <i>Equisetum</i> L.“, биохемија, 06.03.2009. године 6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: биохемија
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
СЕКУНДАРНИ БИОМОЛЕКУЛИ У ВРСТАМА <i>ALLIUM SECT. CODONOPRASUM</i> RCHV. – БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ, ФИТОХЕМИЈСКИ И ХЕМОТАКСОНОМСКИ АСПЕКТИ

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страна поглавља, слика, шема, графикона и сл.

Докторска дисертација мр Наташе Симин написана је на 333 стране, садржи: 109 табела, 134 слике, 95 графика и 494 литературна цитата. Текст је подељен у 8 поглавља: УВОД (2 стране); ОПШТИ ДЕО (73 стране); ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО (32 стране); РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА (60 страна); ЗАКЉУЧАК (4 стране); SUMMARY (3 стране); ЛИТЕРАТУРА (25 страна); ПРИЛОГ (118 страна)

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У УВОДНОМ делу изложен је значај биљака из рода *Allium* L. (лукови) и њихова употреба у традиционалној и официналној медицини. Прегледом литературних података утврђено да су досадашња истраживања углавном била фокусирана на неколико врста овога рода те је истакнута потреба за детаљним хемијским и биохемијским истраживањима самониклих врста са подручја Србије. Како је из досадашњих истраживања оправдано очекивати да су ове биљке значајан ресурс биоактивних молекула за истраживања у овој докторској тези одабрано је десет таксона рода *Allium* sect. *Codonoprasum*: *A. carinatum* subsp. *pulchellum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum*, *A. fuscum* var. *gracile*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. flavum* subsp. *flavum*, *A. melanatherum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. pallens* subsp. *tenuiflorum*, *A. oleraceum* i *A. rhodopeum*. За циљеве истраживања одабрани су:

- Хемијска карактеризација фокусирана на фенолна једињења и испарљива сумпорна једињења
- Биохемијска испитивања антиоксидантног, антиинфламаторног, антимикубног и антимуутагеног, потенцијала и генотоксичног и цитотоксичног ефекта метанолних екстраката наведених врста
- Корелација биолошке активности са хемијским саставом и проналажење хемотаксономских маркера

У ОПШТЕМ ДЕЛУ дисертације дат је детаљан опис испитиваних врста и преглед литературних података везаних за хемијски састав, фармаколошке активности и примену врста рода *Allium*. Истакнуто је да постоји врло мало података о врстама секције *Codonoprasum* које су предмет истраживања ове дисертације. У оквиру прегледа фитохемијског састава детаљно су приказани досадашњи подаци о органосумпорним, органоселеновим, фенолним и сапонинским једињењима присутним у овим врстама, са освртом на хемотаксономска истраживања из ове области. У оквиру поглавља молекулске основе болести, описани су стање оксидативног стреса и његова улога о патогенези обољења човека, механизми деловања неензимских антиоксиданаса, а затим је дат преглед метода за одређивање антиоксидантног потенцијала. Сажето је описан процес мутагенезе, деловање антимуутагена и методе за одређивање антимуутагеног потенцијала. Такође, описан је појам инфламације и дат преглед медијатора инфламације, са посебним акцентом на продукте циклооксигеназног и липоксигеназног пута метаболизма арахидонске киселине, који имају улоге у многим патолошким процесима у људском организму. Описан је појам канцера и дат преглед типова ћелијске смрти, као и метода за одређивање типа ћелијске смрти.

У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ ДЕЛУ дат је преглед коришћених хемикалија и детаљан опис поступака припреме екстраката. Детаљно су описане инструменталне методе анализе хемијског састава испитиваних биљака: *Headspace* GC-MS анализа летљивих компоненти свежих луковица, квалитативна LC-DAD-MS и LC-MS-MS анализа и квантитативна LC-MS/MS анализа 44 одабрана фенолна једињења као и метода одређивање садржаја укупних мономерних антоцијана. Детаљно су описани биохемијски тестови: одређивање активности алииназе, *in vitro* тестови за одређивање антиоксидантног капацитета екстраката и *ex vivo* тест за утврђивање антиинфламаторне активности испитиваних узорака. Такође, дат је детаљан опис метода за одређивање антимикубног и антимуутагеног потенцијала екстраката, као и генотоксичног и цитотоксичног ефекта на здраве и туморске ћелије.

У поглављу РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА презентовани су и протумачени добијени резултати, подељени у две области: хемијски састав и биолошке (антиоксидантна, антиинфламаторна, антимикубна, антимуутагена, генотоксична и цитотоксична) активности. У оквиру резултата везаних за хемијски састав испитиваних врста, приказани су резултати *Headspace* GC-MS анализе летљивих компоненти свежих луковица, резултати квалитативне LC-DAD-MS и LC-MS-MS анализе и PCA (*principle component analysis*) анализе добијених података, садржај 44 одабрана фенолна једињења утврђен применом високо селективне и специфичне LC-MS/MS анализе, садржај укупних мономерних антоцијана и активност алииназе. У делу биолошке активности, приказани су резултати за антиоксидантни потенцијал екстраката одређен применом више стандардних, спектрофотометријских

метода и ESR техником. Антиинфламаторни потенцијал одређен је применом *ex vivo* методе за одређивање потенцијала инхибиције продукције 12-ННТ, ТХВ₂, РГЕ₂ и 12-НЕТЕ метаболита, као показатеља инхибиције цоклооксигеназног и липоксигеназног пута метаболизма арахидонске киселине. Урађена је и корелација добијених резултата антиоксидантне и антиинфламаторне активности. Антимикробни потенцијал екстраката одређен је применом два стандардна теста на осам одабраних бактеријских сојева. Антимутагена активност екстраката испитивана је мерењем њиховог протективног деловања на спонтану и индуковану оксидативну мутагенезу у бактерији *Esherichia coli* WP2. Генотоксични ефекат екстраката испитан је на здравим хуманим фибропластима плућа (MRC-5) и ћелијама карцинома дебелог црева (HT-29). На крају су дати резултати испитивања антипролиферативне активности екстраката према једној нормалној и три туморске ћелијске линије, добијени применом сулфородамин Б (СРБ) теста, као и резултати одређивања способности екстраката да индукују апоптозу и некрозу у овим ћелијским линијама. За већину испитаних врста, хемијски састав и биолошке активности испитивани су први пут у овом раду.

У ЗАКЉУЧКУ су сумирани и истакнути најзначајнији резултати дисертације.

Поглавље SUMMARY обухвата сажет преглед ове дисертације на енглеском језику.

ЛИТЕРАТУРА цитирана у овој докторској тези обухвата 494 библиографске јединице и указује на значај и актуелност предузетих истраживања, али и одсуство резултата везаних за већину врста обухваћених овом тезом.

У ПРИЛОГУ су дати бројни експериментални резултати у облику табела са подацима, калибрационих крива, кривих зависности доза-одговор, затим хроматограми и спектри добијени приликом анализа хемијског састава, који допуњују поглавље РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.

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

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01. јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

1. Simin, N., Orčić, D., Četojević-Simin, D., Mimica-Dukić, N., Anačkov, G., Beara, I., Mitić-Ćulafić, D., Božin, B. (2013). Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). *LWT - Food Science and Technology*, 54, 139–146. (M21)
2. Mimica-Dukić N., Simin N., Svirčev E., Orčić D., Beara I., Lesjak M., Božin B. (2012): The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway. In: Catala A. (Ed.): *Lipid Peroxidation, InTech*, Rijeka, Croatia. ISBN: 978-953-51-0716-3. (M14)
3. Beara I. N., Lesjak M. M., Orčić D. Z., Simin N. Dj., Četojević-Simin D. D., Božin B. N., Mimica-Dukić N. M. (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1): 64-70. (M21)
4. Aleksic, V., Mimica-Dukić, N., Simin, N., Nedeljković, N. S., Knežević, P. (2014). Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. *Phytomedicine*, 21(12), 1666–1674. (M21)
5. Lesjak, M. M., Beara, I. N., Orčić, D. Z., Petar, K. N., Simin, N. Đ., Emilija, S. Đ., Mimica-Dukić, N. M. (2014). Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm. *Journal of Functional Foods*, 7, 257–268. (M21)
6. Simin, N., Mimica-Dukić, N., Lesjak, M., Beara, I., Orčić, D., Jovin, E., Božin, B. (2010): Chemical composition and antioxidant activity of *Allium flavum* L. extracts. *58th International Congress and Annual Meeting of the Society for medicinal Plant and Natural Products Research*, Berlin, Germany, August 29-September 02. *Planta Med.* 76: 1259. P265. (M34)
7. Simin N., Orcic D, Mimica Dukic N, Jovin E, Beara I, Lesjak M, Bozin B. (2011): Chemical profile and biological activities of *Allium melanantherum* Panč. Extracts. *59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Products Research*, Antalya, Turkey, 4th-9th September. *Planta Med.* 77: 1455. PM221. (M34)
8. Mitic-Culafic D, Simin N., Vukovic-Gacic B, Cetojevic-Simin D, Mimica-Dukic N, Nikolic B, Knezevic-Vukcevic J. (2011): Chemical composition and cytotoxicity and genotoxicity of selected *Allium* spp. extracts.

- 9th International Comet Assay Workshop, Kusadasi, Turkey, 13th-16th September. Book of abstracts pp. 95. (M34)
9. Simin N., Mimica-Dukić N., Orčić D., Jovin E., Beara I., Anačkov G., Božin B. (2011): Chemical profile and bioactivity of *Allium carinatum* subsp. *pulchellum* extracts. 5th International Conference on Polyphenols and Health, Sitges, Barcelona, Spain, 17-20 October, Book of abstracts p. 189. Izdavač: Nutrition & Food Science Department; Pharmacy School; University of Barcelona (M34)
 10. Simin N., Orčić D., Francišković M., Balog K., Mitić-Ćulafić D., Bogavac M., Božin B. (2012): Phytochemical profile and biological activities of *Allium carinatum* ssp. *carinatum* L. extract. 2012 International Congress on Natural Product Research, 8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, New York, USA, 28 July - 1 August, 2012. *Planta Medica*, 78: 1191-1191. (M34)
 11. Mimica-Dukić N., Svirčev E., Lesjak M., Beara I., Orčić D., Simin N., Božin B. (2012): Native plants in Serbia - Opportunity for new functional foods and herbal drug. 2012 International Congress on Natural Product Research, 8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, New York, USA, 28 July - 1 August, 2012. *Planta Medica* 78: 1190-1191. (M34)
 12. Simin N., Svirčev (Jovin) E., Orčić D., Balog K., Beara I., Lesjak M., Božin B. (2012): Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Allium paniculatum* L. extracts. 6th Central European Congress on Food, Novi Sad, Serbia, 23-26 May 2012, Abstract Book of 6th Central European Congress on Food, pp. 133-133. (M34)
 13. Simin N., Orčić D., Svirčev E., Francišković M., Lesjak M., Anačkov G., Mimica-Dukić N. (2012): Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Allium pallens* L. extracts. 7th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (7th CMAPSEEC), Subotica, Serbia, 27-30 May 2012. Book of abstracts p. 115. (M34)
 14. Simin, N., Beara, I., Balog, K., Četojević-Simin, D., Lesjak, M., Anačkov, G., Francišković, M. (2013): Phytochemical profile and biological potential of *Allium fuscum* Waldst. et Kit var. *fuscum*. 20th International Congress of Nutrition, Granada, Spain, 15-20 September 2013. *Ann. of Nutr. Metab.* 63: 1654. (M34)
 15. Simin N., Orčić D., Svirčev E., Četojević-Simin D., Anačkov G., Francišković M., Mimica-Dukić N.: Phytochemical profile and biological potential of *Allium rhodopeum* Velen.; 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA2014, Guimaraes, Portugal, 31st August – 4th September 2014; P2P17 367-368. (M34)
 16. Šibul, F., Orčić, D., Svirčev E., Simin, N., Ristić, J., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014): Optimization of Extraction Conditions for Plant Secondary Metabolites, 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin, Poland. Book of abstracts. pp.173. (M34)
 17. Orčić, D., Božin, B., Simin, N., Svirčev, E., Lesjak, M., Beara, I., Mimica-Dukić, N. (2013): LC-MS determination of alliin in selected *Allium* species. 20th International Congress of Nutrition, Granada, Spain, 15-20 September 2013. *Ann. of Nutr. Metab.* 63: 1653. (M34)
 18. Simin, N., Mimica-Dukić, N., Cvejić, J., Orčić, D., Lesjak, M., Francišković, M., Božin, B. (2010): Hepatoprotektivno delovanje ekstrakata bogatih flavonol-glikozidima iz odabranih *Equisetum* vrsta na CCl₄ - indukovano oštećenje jetre pacova (Hepatoprotective effect of flavonol-glycosides rich extracts from *Equisetum* species against CCl₄ – induced liver damage in rats). *XLVIII Savetovanje srpskog hemijskog društva*, 17-18. april, Novi Sad, Srbija. *Knjiga radova*, 176-179. (M63)

VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У оквиру ове дисертације изведена су детаљна фитохемијска и биохемијска испитивања метанолних екстраката десет самониклих таксона рода *Allium* sect. *Codonoprasum*. Из дисертације су проистекли следећи резултати и закључци:

- Диметил-дисулфид је најдоминантнија и у већини врста sect. *Codonoprasum* једина испарљива компонента, што може послужити за њихово разликовање од врста осталих секција рода *Allium* приликом детерминације употребом хемотаксономских маркера.
- Квалитативном LC-DAD-MS и LC-MS-MS анализом метанолних екстраката детектовано је 44 једињења, од којих је 25 прелиминарно идентификованих једињења из класе флавоноида, где су далеко најдоминантнији деривати кверцетина (12 гликозида кверцетина и 9 гликозида метил-кверцетина (рамнетина или изорамнетина). Преостала четири детектована флавоноида су гликозиди кемферола или лутеолина. Утврђено је да нема значајне разлике у квалитативном саставу између узорака исте врсте са различитих локалитета, већ само малих разлика у садржају појединих једињења. Врста *A. pallens* subsp. *tenuiflorum* се и по саставу флавоноида највише издваја од осталих врста, док у екстракту врсте *A. oleraceum* нису детектовани флавоноиди.

- Применом LC-MS-MS технике одређен је садржај 44 фенолна једињења и хинске киселине у екстрактима надземних делова и екстрактима луковица свих 10 таксона. Укупан садржај квантификованих једињења био је знатно већи у надземним деловима биљака него у луковима (6,09–271 mg g⁻¹ s.e. и 0,76–2,85 mg g⁻¹ s.e., респективно). Најдоминантнија флавоноидна једињења су гликозиди кверцетина (рутин, хиперозид, изокверцитрин, изорамнетин), као и кемферол-3-*O*-глукозид (астрагалин). Врста *A. melanantherum* се од осталих издваја на основу високог садржаја рутина и ниског садржаја кверцетин-3-*O*-глукозида, док врсту *A. flavum* од осталих одвајају високи садржаји рутина и кверцетин-3-*O*-глукозида. Врсте *A. pallens* subsp. *tenuiflorum* и *A. oleraceum* за разлику од осталих врста не садрже рутин, а садрже знатну количину хиперозида, што би могло бити значајно са хемотаксономског аспекта.
- Садржај укупних мономерних антоцијана у екстрактима цвасти врста sect. *Codonoprasum* кретао се од 10,7 до 969 µg еквивалената цијанидин-3-*O*-глукозида g⁻¹ s. e.
- Активност ензима алииназе, који је одговоран за формирање једињења која дају мирис и укус луковима, била је веома висока у свим испитиваним врстама (највиша у врсти *A. flavum*).
- Екстракти *A. flavum*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. oleraceum* и *A. paniculatum*, испољили су снажну антиоксидантну активност у тестовима за одређивање способности хватања DPPH[•], ABTS^{•+} и NO радикала и способности инхибиције LP, што указује на присуство једињења са високом редукционом способношћу. Највећу способност хватања OH радикала испољили су екстракти врста *A. pallens* subsp. *tenuiflorum*, *A. fuscum* и *A. rhodopeum*, што указује на присуство једињења са израженим хелирајућим својствима. Екстракт црног лука у већини тестова испољио јачу активност од екстраката sect. *Codonoprasum*.
- Снажну антиинфламаторну активност испољили су екстракт надземних делова врсте *A. flavum* и екстракти целих биљака врста *A. rhodopeum*, *A. oleraceum*, *A. paniculatum* и *A. cepa*. У поређењу са познатим COX-1 инхибитором аспирином и 12-LOX инхибитором кверцетином, екстракти испитиваних врста рода *Allium* показали су слабију способност инхибиције ових ензима, али је активност екстраката била упоредива са активношћу добро познате антиинфламаторне дроге *Plantago major* L. Утврђено је да се екстракт надземних *A. flavum* понаша као селективни 12-ЛОХ инхибитор, што би могло наћи примену у превенцији и лечењу канцерогених оболења, псоријазе, атеросклерозе и реуматоидног артритиса.
- Испитивани екстракти нису испољили антимикуробну активност, изузев екстракта врсте *A. melanantherum* који је показао слабу антибактеријску активност према соју *Staphylococcus aureus*, што се може објаснити изузетно високим садржајем рутина у овом екстракту.
- Екстракт врсте *A. flavum* у нижим концентрацијама показује слаб антимулагени ефекат на индуковану мутагенезу у бактерији *Escherichia coli* WP2, док екстракти врста *A. melanantherum* и *A. carinatum* subsp. *carinatum* у испитиваном опсегу концентрација (0,1 – 4 мг по петри шољи) нису показали антимулагени ефекат ни на спонтану ни на индуковану мутагенезу.
- Екстракт надземних делова врсте *A. flavum* у концентрацији од 15 µg mL⁻¹ показао је слаб генотоксични ефекат на здраве фибропласте плућа, док у ћелијама аденокарцинома дебелог црева није изазвао прекиде ДНК ланаца. Ово указује на опрез у случају евентуалне примене овог екстракта у медицинске сврхе и неопходност строгог дефинисања његове максималне дозвољене дозе. Остали екстракти нису довели до оштећења ДНК у испитиваним ћелијским линијама, што указују да је њихова употреба у концентрацијама нижим од испитиваних безбедна.
- Већина испитиваних екстраката испољила је антипролиферативну активност, али је степен активности зависио од врсте ћелијске линије (MRC-5, MCF7, HT-29 или HeLa) и концентрације екстракта. HT-29 ћелије биле су најрезистентније на деловање како екстраката тако и стандарда фенолних једињења. У поређењу са комерцијалним антитуморским лековима Дохорубицин®-ом и Гемцитабин®-ом, најактивнији екстракти показали су око 100 пута слабије антипролиферативно деловање. Повољни не-тумор/тумор коефицијенти (>1) забележени су за екстракте целих биљака *A. rhodopeum*, *A. paniculatum* и *A. flavum* и екстракт надземних делова *A. melanantherum*, што иде у прилог њиховој потенцијалној примени у антитуморској терапији. Од испитиваних стандарда фенолних једињења најјачу антипролиферативну активност на све четири ћелијске линије испољили су кемферол, кверцетин и кафена киселина, указујући на то да је присуство ових једињења у екстрактима делимично одговорно за њихову цитотоксичну активност. Рутин није показао антипролиферативни ефекат, из чега следи да огромна количина рутина присутна у појединим екстрактима не доприноси њиховој цитотоксичној активности.
- Већина испитиваних екстраката индуковала је смрт у туморским ћелијским линијама.

Екстракти врсте *A. flavum* и екстракт надземних делова врсте *A. rhodopeum*, значајно су индуковали апоптозу у HeLa и/или HT-29 ћелијама, али је индукција ћелијске смрти у ћелијама изведеним из здравог ткива била је још већа, што значајно смањује њихов потенцијал у антитуморској терапији. С друге стране, екстракт надземних делова *A. melanatherum* индуковао је апоптозу и смањивао некрозу у MCF7, при чему није деловао на MRC-5 ћелије. Такође, екстракт целе биљке *A. paniculatum* снажно је иницирао ћелијску смрт у HT-29 ћелијама, при чему је пораст апоптозе био дупло већи од пораста некрозе, док на здраве ћелије није деловао. Екстракт целе биљке *A. rhodopeum* индуковао је апоптозу у HT-29 и HeLa ћелијама, док на ћелије здравог ткива није деловао. Из наведеног следи да екстракти целих биљака *A. paniculatum* и *A. rhodopeum*, као и екстракт надземних делова *A. melanatherum* имају висок потенцијал примене у антитуморској терапији.

- Сумирањем добијених резултата закључује се да су поред добро познатог црног и белог лука, и представници sect. *Codonoprasum* рода *Allium* богати биолошки активним једињењима са широким спектром биолошких активности и да имају висок потенцијал примене у прехранбеној и фармацеутској индустрији.

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

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат је веома рационално приступио обради и анализи великог броја експерименталних података који су успешно систематизовани у логичке целине. Резултати истраживања су аналитички представљени, статистички обрађени, детаљно дискутовани и критички компарирани са резултатима из цитиране литературе. Прегледности резултата значајно су допринели графички прикази и систематичне табеле. На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају одговоре на постављене циљеве у овој докторској дисертацији.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме:
Комисија оцењује да је докторска дисертација урађена потпуно у складу са образложењима наведеним у пријави теме.
2. Да ли дисертација садржи све битне елементе:
Дисертација садржи све битне елементе - дефинисање теме истраживања, преглед постојећих истраживања, детаљан приказ експерименталних метода и техника, јасан и прегледан приказ резултата и њихову дискусију, списак литературе и закључак.
3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци:
На основу комплетног увида у докторску дисертацију, постављене циљеве истраживања, прегледа литературе, добијених резултата и њиховог тумачења, Комисија закључује да ова докторска дисертација има све елементе оригиналног научног рада, који карактерише висок степен интердисциплинарности. Првенствено ова докторска дисертација задире у области фитохемије и биохемије секундарних биомолекула биљака. Коришћењем савремених инструментаних метода које су прилагођене и модификоване за примењена истраживања, добијени су научни резултати, из којих је било могуће извести поуздане и валидне закључке. Иако произишли из веома комплексних истраживања резултати тезе су представљени јасно и груписани у логичке целине. Чињеница да су по први пут изведена систематична, упоредна, хемијска и биохемијска истраживања 11 таксона рода *Allium* sect. *Codonoprasum*, од посебног је научног значаја и интереса. Треба истаћи да су истраживања ове докторске тезе у складу са савременим трендовима у модерној фитофармацији, у изналажењу нових природних производа са израженим антиоксидантним, антиинфламаторним, антимицробним, антимулагеним и антитуморским активностима.
4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања:
По мишљењу комисије ова докторска дисертација нема значајнијих недостатака

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже да се докторска дисертација под називом:

„СЕКУНДАРНИ БИМОЛЕКУЛИ У ВРСТАМА *ALLIUM* SECT. *CODONOPRASUM* RCHB. – БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ, ФИТОХЕМИЈСКИ И ХЕМОТАКСОНОМСКИ АСПЕКТИ“ прихвати, а кандидату мр Наташи Симин одобри одбрана.

У Новом Саду, 07.11.2014.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Мирјана Попсавин, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, председник

др Неда Мимица-Дукић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, ментор

др Горан Аначков, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, члан

др Биљана Божин, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, члан

др Драгана Четојевић-Симин, научни сарадник, Институт за онкологију Војводине, Сремска Каменица, члан

др Драгана Митић-Ђулафић, научни сарадник, Биолошки факултет у Београду, члан