

Укр. М. Томас

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ  
БРОЈ 020-3/34  
08 APR 2010  
НОВИ САД

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ  
Мр Весна Тумбас, дипл. инж. технологије

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ	
1.	Датум и орган који је именовao комисију 27.06.2006. године. Научно-наставно веће Технолошког факултета, на XXVII редовној седници
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: <ul style="list-style-type: none"><li>• др Јасна Чанадановић-Брунет, редовни професор, Примењене и инжењерске хемије, 15.05.2008. године, Технолошки факултет, Нови Сад, ментор;</li><li>• др Соња Ђилас, редовни професор, Примењене и инжењерске хемије, 27.07.1998. године, Технолошки факултет, Нови Сад;</li><li>• др Неда Мимица-Дукић, редовни професор, Биохемија, 01.08.2003. године, Природно-математички факултет, Нови Сад.</li></ul>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ	
1.	Име, име једног родитеља, презиме: Весна, Томо, Тумбас
2.	Датум рођења, општина, република: 01.11.1977. године, Суботина, Суботина, Србија
3.	Датум одбране, место и назив магистарске тезе: 11.10.2005. године, Технолошки факултет, Нови Сад. "Антиоксидативна и биолошка активност екстраката биљака из фамилије Lamiaceae"
4.	Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: Технолошке науке
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:	
„Антирадикалска и антипролиферативна активност екстраката одабраних биљака из фамилија Rosaceae и Ericaceae“	

**IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

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

Докторска дисертација мр Весне Тумбас је веома прегледно и јасно изложена у шест поглавља:

1. Увод (стр. 1 - 3),
2. Општи део (стр. 4 - 65),
3. Експериментални део (стр. 66 - 81),
4. Резултати и дискусија (стр. 82 - 126),
5. Закључак (стр. 127 - 131),
6. Литература (стр. 132 - 156).

Дисертација је написана на 156 страна А4 формата, са 52 оригиналне слике и 24 табеле, цитирано је 326 литературна навода, а на почетку су дате кључне документацијске информације са кратким изводом на српском и енглеском језику.

**V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

У УВОДУ аутор указује на чињеницу да је научно доказано да се повећаним конзумирањем воћа и поврћа смањује ризик од разних болести, као што су канцер, кардиоваскуларне и неуродегенеративне болести и дијабетес. Мишљење многих стручњака је да, поред минерала и витамина, органска једињења која имају својство антиоксиданата утичу позитивно на здравље. Даље се истиче да се у новије време напушта употреба синтетских антиоксиданата у прехранбеној индустрији због токсиколошких разлога, док интерес за примену природних антиоксиданата стално расте. Значајну групу природних антиоксиданата чине биљни секундарни метаболити које чине биљни феноли (фенолне киселине, флавоноли, изофлавоноли, флаван-3-оли, антоцијани, проантоцијанидини, танини итд), терпеноиди, токофероли, глукозинолати, као и једињења која садрже сумпор. Поред антиоксидативних, ова једињења поседују и антимулагена, анти-инфламаторна, антиукусна и антимикуробна својства, а такође смањују и ризик од појаве кардиоваскуларних обољења. Аутор наводи да аеробни организми *in vivo* континуално стварају слободне радикале и реактивне кисеоничне врсте. Слободни радикали су најчешће врло реактивни и у повећаним концентрацијама могу да доведу до оштећења ћелија и ткива што може бити узрок великог броја обољења. Велики значај за ефикасно сузбијање штетног деловања слободних радикала имају антиоксиданти који се уносе путем исхране, као што су витамин Е, витамин Ц, каротеноиди и полифенолна једињења биљног порекла. Кандидаткиња истиче да полифенолна једињења поседују многа биолошка и фармаколошка дејства, што указује да они у значајној мери утичу на основне ћелијске функције као што су раст, деоба и/или смрт ћелије (апоптоза). Даље се наводи да је позната чињеница да су дивље врсте биљака витамински далеко богатије од гајених врста и да је у фамилијама Rosaceae и Ericaceae велики број дивљих самониклих биљака које расту на нашем подручју. Стога су као предмет истраживања ове докторске дисертације одабране биљке из ових фамилија: боровница (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae), брусница (*Vaccinium macrocarpon* L., Ericaceae), шипка (*Rosa canina* L., Rosaceae) и глог (*Crataegus oxyacantha* L., Rosaceae). У Уводу се даље истиче да је у оквиру рада на извођењу ове докторске дисертације испитан садржај укупних фенолних једињења, флавоноида и антоцијана у пречишћеним екстрактима боровнице, бруснице, шипка и глога, спектрофотометријском методом. Квалитативни и квантитативни састав фракционисаних екстраката испитиваних бобица одређен је HPLC методом. Антирадикалска активност свих добијених фракција екстраката на реактивне супероксид анјон и хидроксил радикале, и на стабилне 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикале (DPPH<sup>•</sup>), као и способност молекула антиоксиданата присутних у фракцијама екстраката испитиваних биљака да стварају стабилне слободне радикале током реакције са супероксид анјон радикалима испитана је применом најсавременије аналитичке технике за директну детекцију и карактеризацију слободних радикала – електрон спин резонантне (ESR) спектрометрије. У завршној фази рада испитана је *in vitro* антипролиферативна активност фракција екстраката бобица, њиховим деловањем на раст три хистолошки различите хумане ћелијске линије: HeLa (епителни карцином цервикса), HT-29 (аденокарцином дебелог црева) и MCF-7 (аденокарцином дојке).

Поглавље ОПШТИ ДЕО састоји се из четири дела. Кандидаткиња најпре веома студиозно пише о реактивним прооксидативним врстама, задржавајући се на слободнорадикалским врстама. Објашњава механизам настанка слободних радикала као и последице одвијања слободнорадикалских реакција у биолошким системима и храни. У другом делу овог поглавља се веома детаљно анализирају антиоксидативни системи заштите, и то *in vivo* антиоксиданти (ензимски антиоксиданти, металопротеини и нискомолекуларни антиоксиданти), фитохемикалије (полифенолна једињења, аскорбинска киселина, токофероли и каротеноиди), као и антиоксиданти који су присутни у храни, са посебним акцентом на њихове промене током процеса прераде хране. Испитивањима иностраних аутора, као и претходним испитивањима на предмету Органска хемија на Технолошком факултету у Новом Саду, утврђено је да

биљке садрже, поред мноштва фитонутријената, и полифенолна једињења. Велики број фитохемикалија има антиоксидативно деловање, али су полифенолна једињења привукла највећу пажњу истраживача. Стога, кандидаткиња посебно сериозно обрађује полифенолна једињења као веома важну групу биолошки активних нунутријената са антиоксидативном активношћу. У овом поглављу изнети су и литературни подаци на основу којих се бобичасто воће из фамилија Ericaceae и Rosaceae може сматрати потенцијалним извором антиоксиданата, са посебним акцентом на боровници, брусници, шипку и глогу, који су и одабрани као предмет истраживања ове докторске дисертације. Како кандидаткиња наводи у последњем делу поглавља ОПШТИ ДЕО, научници су одавно открили везу између хране и здравља. Стога кандидаткиња анализира улогу функционалне хране, нарочито са аспекта очувања антиоксидативног статуса организма и превенције многих болести проузрокованих оксидативним стресом. Нарочито је у овом делу детаљно анализирана улога антиоксиданата у превенцији канцерогених процеса у организму.

На основу проучене и систематизоване литературе, докторант је био у могућности да правилно анализира и објасни добијене резултате и да их упореди са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици.

У поглављу ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО докторант наводи да је експериментални рад ове докторске дисертације урађен у лабораторијама Одељења за органску хемију и аналитичку хемију Технолошког факултета, Универзитета у Новом Саду, Института за онкологију у Сремској Каменици, Института за молекуларну фармакологију и токсикологију на Департману за биомедицинске науке Универзитета ветеринарске медицине у Бечу и Центра за мултидисциплинарна истраживања Универзитета у Београду. Кандидаткиња детаљно описује поступке екстракције, прецишћавања и фракционисања екстраката применом екстракције на чврстој фази (Solid Phase Extraction – SPE). Добијене су фракције екстраката које садрже поларна једињења, укључујући и витамин Ц (Fr1), неутрална полифенолна једињења (Fr2) и кисела полифенолна једињења (Fr3). Даље, описује спектрофотометријске методе за одређивање укупних фенолних једињења (метода по Folin-Ciocalteu), укупних флавоноида (метода по Markamu) и антоцијана („singl“ pH i pH диференцијална метода), као и методе високопритисне течне хроматографије (High Pressure Liquid Chromatography – HPLC) за квалитативну и квантитативну анализу полифенолних једињења и витамина Ц у добијеним фракцијама екстраката испитиваних бобица. Антирадикалска активност свих добијених фракција екстраката утврђена је применом електрон спин резонантне (ESR) спектрометрије, испитивањем њиховог деловања на реактивне супероксид анјон и хидроксил радикале, и на стабилне 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикале (DPPH<sup>•</sup>). ESR је примењена и за детекцију слободних радикала антиоксиданата присутних у фракцијама екстраката испитиваних биљака током реакције са супероксид анјон радикалима. Антипролиферативна активност фракција екстраката испитиваних бобица на раст три хистолошки различите хумане ћелијске линије, HeLa (епителни карцином цервикса), HT-29 (аденокарцином дебелог црева) и MCF-7 (аденокарцином дојке), испитана је применом фотометријске методе (MTT тест).

Добијени резултати су на адекватан начин статистички обрађени. Утврђена је аритметичка средина, стандардна грешка, линеарна међузависност између две променљиве - резултата антирадикалских тестова и резултата HPLC анализа садржаја полифенолних једињења и витамина Ц (кофицијент корелације – "r"), значајност разлике између аритметичких средина применом једнодимензионе класификације анализе варијансе и вишеструког теста интервала (Tuckey-ов тест између више аритметичких средина).

Резултати претходно описаних испитивања као и њихова анализа приказани су у поглављу РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА на 9 слика и у 33 табеле. Ово поглавље је, према задатку рада, подељено на четири целине. Спектрофотометријским методама утврђен је садржај укупних полифенолних једињења, флавоноида, укупних и мономерних антоцијана у прецишћеним екстрактима бобица, док је HPLC методом утврђен квантитативан и квалитативан састав фракција екстраката бобица. У фракцијама које садрже поларна једињења, Fr1, утврђено је присуство витамина Ц и одређен је његов садржај. У фракцијама Fr2, које садрже неутрална полифенолна једињења, утврђено је присуство флавоноида и одређен је њихов појединачан садржај, док су у фракцијама Fr3, у којима су издвојена кисела полифенолна једињења, детектоване фенолне киселине и одређен је њихов квантитативан садржај. Након тога, кандидаткиња приказује резултате ESR анализа антирадикалских тестова, односно утицаја фракција екстраката бобица на стварање и трансформацију супероксид анјон, хидроксил и DPPH<sup>•</sup>. Детаљна анализа и дискусија ових резултата је извршена у поређењем хемијског састава фракција екстраката бобица добијених HPLC анализом, и механизма антиоксидативног деловања биоактивних компонената екстраката. Дискусија добијених резултата обављена је у складу са најновијим литературним наводима из области хемије слободних радикала и антиоксиданата.

ESR спектрална анализа слободних радикала антиоксиданата присутних током реакције фракција екстраката бобица поткрепљене су механизмима који су у складу са саставом анализираних фракција екстраката бобица и наведеном литературом. Веза између резултата HPLC анализа и ESR анализа антирадикалских тестова утврђена је и анализом линеарне међузависности између ове две променљиве, тзв. корелационом анализом. У последњем делу поглавља РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА анализирани су резултати испитивања антипролиферативне активности фракција екстраката бобица *in vitro* на раст ћелијских линија епителног карцинома цервикса, аденокарцинома дебелог црева и аденокарцином дојке, и дискутовани узимајући у обзир резултате HPLC анализа састава испитаних фракција.

У обављеној анализи кандидаткиња је испољила велико теоретско знање, вешто је користила бројне податке из цитиране литературе компарирајући их са резултатима сопствених истраживања, а уочене појаве успешно је објаснила у духу савремених истраживања из области антиоксиданата и слободних радикала, да би на крају изнела валидне закључке.

ЗАКЉУЧЦИ су веома добро изведени из добијених резултата и њихове дискусије, те се могу сматрати поузданим.

У последњем поглављу ЛИТЕРАТУРА аутор наводи 326 референци које су коришћене у писању ове дисертације и које су цитиране на умешан и правилан начин. Избор референци је актуелан (више од половине цитата су новијег датума) и примерен тематици која је проучавана.

**VI** Списак научних и стручних радова који су објављени или прихваћени за објављивање на основу резултата истраживања у оквиру рада на докторској дисертацији

**уз напомену:**

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

Истраживања која су урађена у оквиру докторске дисертације кандидаткиње мр Весне Тумбас, дипл. инж., верификована су у часописима и у саопштењима на скуповима међународног и националног значаја, и то:

M22 – Рад у истакнутом међународном часопису:

1. **Vesna T. Tumbas**, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Lars Gille, Sonja M. Đilas, Gordana S. Četković: CHARACTERIZATION OF THE FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF ROSE HIP (*Rosa canina* L.) EXTRACT, *International Journal of Food Properties*, прихваћен за штампу 04.03.2009. године

M23 – Рад у међународном часопису:

1. **Vesna T. Tumbas**, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Lars Gille, Sonja M. Đilas, Gordana S. Četković: SUPEROXIDE ANION RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF BILBERRY (*Vaccinium myrtillus* L.), *Journal of Berry Research*, 1, прихваћен за штампу 26.02.2009. године

M52 – Рад у часопису националног значаја:

1. **Vesna T. Tumbas**, Slađana M. Savatović, Sonja M. Đilas, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Gordana S. Četković: CRANBERRY – A GOOD SOURCE OF NATURAL ANTIOXIDANTS, *Acta Periodica Technologica*, 2006, Vol. 37, str. 171- 178.
2. **Vesna T. Tumbas**, Sonja M. Đilas, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Gordana Četković, Slađana M. Savatović: SOLID-PHASE EXTRACTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM COMMERCIAL CRANBERRY EXTRACT AND ITS ANTIRADICAL ACTIVITY, *Acta Periodica Tehnologica*, 2007, Vol. 38, str. 157- 164, ISSN 1450-7188.

M32 – Предавање по позиву са међународног скупа штампано у изводу:

1. **Vesna T. Tumbas**: Antiradical and antiproliferative activity of selected plant extracts from *Rosaceae* and *Ericaceae* families, *Third European Workshop on Food Engineering and Technology*, Napulj, 21-22. Maj 2009, str. 23.
2. **Vesna T. Tumbas**, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Sonja M. Djilas, Gordana S. Četković, Dragana Četojević-Simin: CHARACTERIZATION AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF BILBERRY (*Vaccinium myrtillus* L.) ANTIOXIDANTS, *COST863 WG4 Joint Meeting with The 4th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2009)*, Bioactive compounds in berry fruits and human health benefits, Harrogate International Centre, Harrogate, UK, 7-10. Decembar 2009, str. 7.

M34 – Саопштење са међународног скупа штампано у изводу:

1. Jasna M. Čanadanović-Brunet, **Vesna T. Tumbas**, Gordana S. Četković, Sonja M. Đilas, Slađana S. Savatović: ESR SPECTRAL STUDY OF RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF CRANBERRY EXTRACT, 5th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries: Chemical Sciences at the European Crossroads, Ohrid, Macedonia: 10-14. Septembar 2006, str. 168.
2. Sonja M. Đilas, **Vesna T. Tumbas**, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Gordana S. Četković, Slađana M. Savatović: ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TITAN(II)-OXIDE AND CRANBERRY EXTRACT ON LIPID PEROXIDATION OF COCONUT OIL, 9th International Symposium Interdisciplinary Regional Research (ISIRR) Hungary – Romania – Serbia and Montenegro, Novi Sad: 21-23. Jun, 2007.
3. Jasna M. Čanadanović-Brunet, **Vesna T. Tumbas**, Sonja M. Djilas, Gordana S. Četković, Slađana S. Savatović: SOLID PHASE EXTRACTION AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF CRANBERRY, *2nd International Congress on Food and Nutrition "Food for Future"*, Istanbul, Turkey: 24-26. Oktobar, 2007, str. 193.
4. **Vesna T. Tumbas**, Sonja M. Djilas, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Gordana S. Četković, Jelena J. Vulić: THE ROLE OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HAWTHORN BERRIES (*Crataegus oxyacantha* L.), *5th International Meeting "Advances in antioxidants (trace elements, vitamins and polyphenols)" Molecular mechanisms, nutritional and clinical aspects*, Monastir - Sousse, Tunisia: Faculty of Medicine, Monastir, Tunisia, 11-15. Oktobar, 2008, str. 74- 75.

5. Sonja M. Djilas, **Vesna T. Tumbas**, Gordana S. Ćetković, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Željko Knez: ASSESSMENT OF POLYPHENOLIC CONTENT AND DPPH RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF ROSE HIP (*Rosa canina* L.), *Euro Food Chem XV – Food for the Future*, Copenhagen, 5-8. Jul 2009, str. 114.

6. Gordana S. Ćetković, Jasna M. Čanadanović-Brunet, Sonja M. Djilas, **Vesna T. Tumbas**: INTERACTION OF BLUEBERRY PHENOLIC EXTRACTS WITH STABLE RADICALS – KINETIC STUDY, *5th International Conference on Polyphenols Applications, Bridging Bioefficacy to Innovations & Applications*, Malta, 29-30. Oktobar 2009, str. 63.

## VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У раду су испитани хемијски састав, антирадикалска и антипролиферативна активност фракционисаних екстраката бобица из фамилија Ericaceae, боровница (*Vaccinium myrtillus* L.) и брусница (*Vaccinium macrocarpon* L.) и фамилије Rosaceae, шипка (*Rosa canina* L.) и глог (*Crataegus oxyacantha* L.).

Испитивања хемијског састава биљних екстраката обухватила су спектрофотометријско одређивање садржаја укупних полифенолних једињења, флавоноида и антоцијана, као и квалитативну и квантитативну HPLC анализу.

Резултати спектрофотометријских испитивања указују да је највећи садржај укупних феноних једињења код екстракта шипка (457,45 мг/г), флавоноида код екстракта боровнице (224,71 мг/г), антоцијана код екстракта бруснице (81,63 мг/г), а мономера антоцијана код екстракта боровнице (58,45 мг/г). Генерално, већи садржај антоцијана забележен је код бобица из фамилије Ericaceae, док је количина укупних полифенолних једињења већа код бобица из фамилије Rosaceae.

Квалитативном HPLC анализом утврђено је да фракције екстраката испитиваних бобица садрже поларна једињења - витамин Ц (Fr1), неутрална полифенолна једињења – флавоноиде (Fr2) и кисела полифенолна једињења (Fr3).

На основу квантитативне HPLC анализе четири испитиване врсте бобица из фамилија Ericaceae и Rosaceae може се закључити да је најзаступљенији флавоноид у свим фракцијама Fr2 био кверцетин, где су његови удели у укупном приносу флавоноида у свим случајевима били преко 50%. Доминантна фенолна киселина код испитиваних бобица из фамилије Ericaceae, боровнице и бруснице, је п-кумаринска киселина, док је код бобица из фамилије Rosaceae, шипка и глога, то била елагинска киселина чији садржај у случају шипка достиже скоро 90% (404,1942 µг/г) од укупног садржаја фенолних киселина у фракцији Fr3 (454,2292 µг/г). Бобице из фамилије Rosaceae су богатије витамином Ц, где је код глога забележена највећа количина овог витамина (2043 µг/г). Код свих испитаних бобица садржај витамина Ц је већи од укупног садржаја флавоноида и укупног садржаја фенолних киселина. Такође, садржај укупних фенолних киселина је дупло већи од садржаја укупних флавоноида, код свих испитаних бобица, осим код боровнице.

Применом ESR спектроскопије, једине методе за директну детекцију слободних радикала, одређена је антирадикалска активност фракција екстраката боровнице, бруснице, шипка и глога на реактивне супероксид анјон и хидроксил радикале, као и на стабилне DPPH радикале. Детекција краткоживећих супероксид анјон и хидроксил радикала омогућена је применом "spin trapping" методе, коришћењем 5,5-диметил-1-пиролин-N-оксида (DMPO) као "spin trap" једињења.

Фракције Fr1 екстраката испитиваних бобица које садрже витамин Ц, су показале најбоље антирадикалско деловање на супероксид анјон радикале, односно имале су најниже EC<sub>50</sub> вредности. Најнижа EC<sub>50</sub><sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup></sup> вредност је забележена за фракцију Fr1 глога који и садржи највише витамина Ц (2043 µг/г), а највећа за фракцију Fr1 бруснице код које је HPLC анализом утврђена најмања количина витамина Ц (754 µг/г). Може се закључити да су ови резултати у сагласности са HPLC анализама садржаја фракција Fr1 екстраката бобица. Све фракције Fr1 екстраката бобица, осим у случају бруснице, су показале ниже антирадикалске активности у модел систему са супероксид анјон радикалима од фракција које садрже полифенолна једињења, флавоноиде (Fr2) и фенолне киселине (Fr3). Најизраженију активност у овом систему показале су фракције Fr2 шипка и глога које редукују ESR сигнала од 50%, односно 100% постигле при истим концентрацијама од 0,012 мг/мл, односно 0,5 мг/мл. Фракције екстракта бруснице Fr2 и Fr3 гасе ESR сигнал супероксид анјон радикала при концентрацији од 3 мг/мл.

Нешто ниже антирадикалске активности фракција Fr1 екстраката бобица детектоване су у Фентоновом модел систему. Поред тога, ове активности су биле боље од активности других фракција бобица на реактивне хидроксил радикале, осим у случају фракције Fr1 боровнице. Резултати антирадикалске активности фракција Fr1 су у сагласности са HPLC анализама садржаја витамина Ц у овим фракцијама. Наиме, фракције Fr1 добијене из екстраката бобица које припадају фамилији Rosaceae (шипка и глог) су имале израженији утицај на стварање и трансформацију хидроксил радикала од истих фракција екстраката бобица из фамилије Ericaceae (боровница и брусница) што указује да витамин Ц има већу антирадикалску активност на хидроксил радикале. Fr1 шипка гаси ESR сигнал хидроксил радикала при концентрацији од 0,1 мг/мл, Fr1 глога при концентрацији од 0,25 мг/мл док фракције Fr1 боровнице и бруснице постижу исти ефекат при концентрацијама 2 и 3 мг/мл.

У модел систему са DPPH радикалима фракције екстраката свих испитиваних бобица које садрже витамин

Ц испољиле су лошије антирадикалске активности у односу на фракције које садрже полифенолна једињења. Тако фракција Fr1 бруснице није показала никакву антирадикалску активност на DPPH<sup>•</sup> радикале у опсегу концентрација 0,5 – 0,25 мг/мл.

Поређењем антирадикалске активности у модел систему са супероксид анјон радикалима тј. EC<sub>50</sub><sup>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></sup> вредности фракција Fr2 и фракција Fr3 екстракта четири испитиване врсте бобица, уочено је да се њихове антирадикалске активности нису статистички значајно разликовале ( $p < 0,05$ ). Такође, ове вредности су мање од EC<sub>50</sub> вредности добијених у осталим антирадикалским тестовима. Активности фракција Fr2 и Fr3 екстракта бруснице су мање од активности ових фракција екстракта боровнице, шипка и глога, што је у сагласности са њиховим нижим садржајем полифенолних једињења, и флавоноида и фенолних киселина, утврђеним HPLC анализом.

Међусобним поређењем антирадикалских активности фракција Fr2 екстракта испитиваних бобица у Фентоновом модел систему, може се закључити да је фракција Fr2 екстракта боровнице имала највећу антирадикалску активност, а екстракта бруснице најмању. Ови су резултати у складу са утврђеним садржајем флавоноида у наведеним фракцијама, где је највише флавоноида забележено код фракције Fr2 екстракта боровнице (1328,5818  $\mu\text{g/g}$ ), а најмање код исте фракције екстракта бруснице (18,2316  $\mu\text{g/g}$ ). Исти закључак се може извести и за фракције Fr3 екстракта испитиваних бобица, где фракција Fr3 екстракта бруснице са најнижим садржајем фенолних киселина није имала утицај на стварање и трансформацију хидроксил радикала у опсегу концентрација 0,25 – 3 мг/мл, док је најбоља активност забележена у случају фракције Fr3 екстракта боровнице (при концентрацији од 0,5 мг/мл постиже AA<sup>•OH</sup> = 100%, EC<sub>50</sub><sup>OH</sup> = 0,117 мг/мл). Фракција Fr3 екстракта шипка је такође показала добру антирадикалску активност на хидроксил радикале (EC<sub>50</sub><sup>OH</sup> = 0,212 мг/мл). Ова фракција садржи значајну количину елагинске киселине која је димер галне киселине, односно дилактон хексахидроксибензилне киселине.

У модел систему са стабилним DPPH радикалима најбоље антирадикалске активности, показале су фракције Fr2 екстракта бобица које садрже флавоноиде, и то фракција Fr2 екстракта боровнице. Присуство Fr2 која је и најбогатија флавоноидима (1328,5818  $\mu\text{g/g}$ ), нарочито кверцетином (841,8575  $\mu\text{g/g}$ ), елиминиса DPPH радикале при концентрацији од 0,075 мг/мл, EC<sub>50</sub><sup>DPPH<sup>•</sup></sup> = 0,025 мг/г). Међусобним поређењем EC<sub>50</sub><sup>DPPH<sup>•</sup></sup> вредности ових фракција може се уочити да не постоји статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) између вредности добијених за фракције екстракта боровнице, шипка и глога, док је значајно већа вредност код фракције екстракта бруснице вероватно последица знатно мање количине флавоноида присутних у овој фракцији. Фракције екстракта боровнице, бруснице, шипка и глога које садрже фенолне киселине, Fr3, имале су мање антирадикалске активности на стабилне DPPH<sup>•</sup>. Највећу антирадикалску активност је показала фракција Fr3 екстракта боровнице која постиже потпуно елиминисање DPPH<sup>•</sup> при концентрацији од 0,05 мг/мл (EC<sub>50</sub><sup>DPPH<sup>•</sup></sup> = 0,017  $\mu\text{g/g}$ ). Најмању антирадикалску активност је испољила фракција Fr3 екстракта бруснице која постиже AA<sup>DPPH<sup>•</sup></sup> = 100% при испитиваној концентрацији од 2 мг/мл, а EC<sub>50</sub><sup>DPPH<sup>•</sup></sup> вредност је 1,066  $\mu\text{g/g}$ .

Све фракције екстракта испитиваних бобица су показале веће антирадикалске активности на супероксид анјон и хидроксил радикале, док су само фракција Fr2 боровнице и фракција Fr3 глога ефикасније елиминисале DPPH<sup>•</sup> од синтетичког антиоксиданта БХА.

Када су фракције Fr1 екстракта испитиваних бобица подвргнуте ESR спектралној анализи у присуству супероксид анјон радикала, а без додатка "spin trap" (DMPO), детектовани су дублети у ESR спектрима у случају све четири испитиване фракције Fr1. Након обраде спектра компјутерском симулацијом и поређењем добијене константе хиперфиног цепања са литературним подацима, а у складу са високим садржајем витамина Ц одређеним HPLC анализама у овим фракцијама, може се тврдити да је детектована слободнорадикалска врста аскорбил анјон радикал. Након анализе ESR сигнала слободних радикала насталих током реакције фракције Fr2 екстракта боровнице са супероксид анјон радикалима, без присуства "spin trap" једињења (DMPO) компјутерском симулацијом добијене су константе хиперфиног цепања које, по литературним наводима, одговарају кверцетин семихинон радикалу. Потврда порекла добијеног слободног радикала у све четири фракције Fr2 екстракта испитиваних бобица су и резултати HPLC анализа који су показали да је кверцетин најдоминантнији флавоноид у наведеним фракцијама са масеним уделом већим од 50% од укупних детектованих флавоноида.

Врло добра корелација ( $r > 0,8$ ) утврђена је између садржаја витамина Ц, рутина и ванилинске киселине са антирадикалским активностима на супероксид анјон радикале, као и ванилинске киселине и антирадикалске активности на хидроксил радикале. Добра корелација ( $r > 0,5$ ) забележена је између укупног садржаја фенолних киселина и AA<sub>2</sub><sup>•-</sup> и AA<sup>DPPH<sup>•</sup></sup>, садржаја витамина Ц и AA<sup>OH</sup> и AA<sup>DPPH<sup>•</sup></sup>, садржаја рутина и хлорогенске киселине са AA<sup>DPPH<sup>•</sup></sup> и садржаја кампферола и AA<sup>OH</sup>. Остали корелациони коефицијенти указали су на осредњу ( $r < 0,5$ ) или слабу ( $r < 0,3$ ), али позитивну узајамну зависност између садржаја антиоксиданата и антирадикалске активности. Такође, неопходно је узети у обзир и чињеницу да су екстракти комплексне смеше природних једињења и да њихова антирадикалска активност није резултат активности само једне компоненте. Разлике у антиоксидативној активности природних екстракта

последица је различите активности појединачних полифенолних једињења, али и њихових међусобних антагонистичких и синергистичких деловања.

На основу резултата испитивања дејства фракција екстраката бобица на раст три хистолошки различите хумане ћелијске линије може се уочити да су фракције екстраката испитиваних бобица које садрже витамин Ц, односно Fr1, испољиле стимулативно дејство на раст све три ћелијске линије, односно да нису показале антипролиферативно деловање у испитаном опсегу концентрација. Фракције екстраката свих испитиваних бобица које садрже флавоноиде, Fr2, показале су израженији ефекат на раст све три ћелијске линије од фракција Fr3 које садрже фенолне киселине. На основу израчунатих  $EC_{50}$  вредности може се закључити да су најизраженија антипролиферативна дејства, без статистички значајне међусобне разлике ( $p < 0.05$ ), показале фракција Fr2 екстракта боровнице на MCF-7 ( $EC_{50}^{MCF-7} = 166.84$  мг/мл) и HT-29 ћелијске линије ( $EC_{50}^{HT-29} = 194.62$  мг/мл), и фракција Fr2 екстракта шипка у случају HeLa ћелијске линије ( $EC_{50}^{HeLa} = 80.63$  мг/мл). Узимајући у обзир резултате HPLC анализа којима је потврђен највећи садржај флавоноида у фракцијама Fr2 боровнице и шипка, ови резултати указују на чињеницу да су флавоноиди били ефикаснији у инхибицији раста туморских ћелија од фенолних киселина. Најмању осетљивост показале су ћелијске линије MCF-7 и HT-29 према фракцији Fr3 екстракта бруснице, где антипролиферативна активност ове фракције на раст наведених ћелијских линија није достигла 50% у испитиваном опсегу концентрација. Узимајући у обзир и резултате HPLC анализа који су потврдили највећи садржај полифенолних једињења управо код ових фракција, може се претпоставити да су полифенолна једињења заслужна за антипролиферативно деловање фракција екстраката бобица.

### **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

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

Кандидаткиња мр Весна Тумбас, дипл. инж., је успешно и у целости обавила истраживања која су била предвиђена планом датим у пријави ове дисертације. Добијени резултати су проистекли из веома обимних, оригинално постављених лабораторијских испитивања састава, антирадикалске и антипролиферативне активности екстраката одабраних биљака из фамилија Ericaceae и Rosaceae. Резултати ових истраживања су систематично, јасно и прегледно приказани и дискутовани. Интерпретација резултата заснива се на добром познавању хемије слободних радикала и природних антиоксиданата, као и на најновијим доступним научним сазнањима, те се начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивно.

**IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

**НАПОМЕНА:** 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  
Дисертација је написана у потпуном складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе  
Дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Дисертација представља оригинални допринос науци јер је веома комплексним истраживањем доказано да природни антиоксиданти, фракционисани у три групе (витамин Ц, флавоноиди и фенолне киселине), изоловани из бобичастог воћа из фамилија Ericaceae и Rosaceae (бруснице, боровнице, шипка и глога), испољавају веома снажно антирадикалско дејство на супероксид анион, хидроксил и DPPH• радикале. Екстракти бобица су пречишћени и фракционисани екстракцијом на чврстој фази у циљу што прецизнијег изоловања и валоризације појединачних антирадикалских и антипролиферативних активности. Сви антирадикалски тестови су спроведени применом најсавременије методе за детекцију слободних радикала - ESR спектроскопије. Поред тога, ESR спектроскопијом и компјутерском симулацијом добијених спектра утврђено је присуство слободних радикала антиоксиданата, кверцетина и витамина Ц, током реакције одговарајућих фракција екстраката бобица са реактивним супероксид анион радикалима. На основу ових резултата претпостављени су механизми антиоксидативног деловања присутних класа природних антиоксиданата. Утврђено је да су за антипролиферативно деловање бобица, испитано у овој докторској дисертацији на ћелијске линије епителног карцинома цервикса, аденокарцинома дебелог црева и аденокарцинома дојке, одговорна полифенолна једињења (фенолне киселине и флавоноиде), док витамин Ц није утицао на раст ћелија канцера.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања  
Недостаци дисертације нису уочени.

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Полазећи од позитивне оцене докторске дисертације МР ВЕСНЕ ТУМБАС, дипл. инж. Комисија са задовољством предлаже да се прихвати ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ, а кандидаткињи одобри одбрана овог рада.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ