

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

-обавезна садржина- свака рубрика мора бити попуњена

(сви подаци уписују се у одговарајућу рубрику, а назив и место рубрике не могу се мењати или изоставити)

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију</p> <p>17.09.2018., Наставно-научно веће Медицинског факултета Универзитета 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 Ружица Игић, редовни професор, 01.01.2005., Ботаника, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, председник</p> <p>2. др Бранислава Срђеновић Чонић, ванредни професор, 08.03.2018., Токсиколошка хемија, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, члан</p> <p>3. др Љиља Торовић, ванредни професор, 21.04.2016., Фармација (Броматологија), Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, члан</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме:</p> <p>Емилиа, Иван, Глигорић (рођ. Шефер)</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава:</p> <p>03.03.1989., Нови Сад, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p> <p>Медицински факултет Универзитета у Новим Саду, Интегрисане студије фармације, магистар фармације</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</p> <p>2012, Докторске академске студије клиничке медицине</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
<p>Биолошки потенцијал и хемијска анализа врста рода <i>Salix</i> L. (Salicaceae) са територије Републике Србије</p>

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Докторска дисертација маг. фарм. Емилије Глигорић садржи 7 поглавља:

1. Увод (стр. 1-2)
2. Општи део (стр. 3-33)
3. Циљеви и радне хипотезе (стр. 34)
4. Експериментални део (стр. 35-53)
5. Резултати и дискусија резултата (стр. 54-122)
6. Закључак (стр. 123-126)
7. Литература (стр. 127-145)

Дисертација је написана на 145 страна, А4 формата, садржи 18 слика, 13 табела, 58 графикана и 156 литературних навода. На почетку докторске дисертације дата је кључна документација са изводом на српском и енглеском језику.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације је јасно и прецизно формулисан, у складу са садржајем истраживања.

Апстракти на српском и енглеском језику укратко описују разлоге, ток и резултате истраживања.

Поглавље **Увод** указује на значај коре врбе и њену улогу у савременом развоју лекова из лековитих биљака. Истакнуто је да су многе врсте врба, иако широко распрострањене у природи, до сада недовољно испитане, као и да географско подручје значајно утиче на садржај секундарних метаболита и биолошки потенцијал биљних врста. Додатно се указује на чињеницу да лист врбе, који се као отпадни продукт одбацује након сакупљања коре, није окарактерисан у погледу хемијског састава и биолошких активности, а представља перспективан извор лековитих супстанци. Такође, истакнут је значај поступка екстракције уз посебан осврт на савремене методе, као основе за добијање квалитетних екстраката.

Поглавље **Општи део** приказује релевантна научна сазнања у испитиваној области и састоји се из шест целина. У првој целини описане су морфолошке карактеристике рода *Salix* уз осврт на таксономску класификацију унутар рода. У другој целини дате су карактеристике сваке од седам испитиваних врста рода *Salix*. У наредне две целине описана је употреба врбе кроз историју, кора као дрога и њене основне активне компоненте уз посебан акценат на салицилни гликозид – салицин, фенолна и флавоноидна једињења. У петој целини обрађена су многобројна деловања, првенствено коре беле врбе, од којих се истичу антиинфламаторна, аналгетичка, антипиретичка, антикарциногена, антимикуробна, антихолинестеразна и антиоксидантна активност. У последњој целини дата је теоријска основа класичних и савремених поступака екстракције који су примењени у истраживању.

Комисија сматра да је наслов дисертације прецизан и јасно формулисан. Увод и општи део пружају савремен и свеобухватан приказ проблематике којом се истраживање бави, дефинисано је подручје истраживања и прецизно су објашњени разлози истраживања.

У поглављу **Циљеви и радне хипотезе** јасно су дефинисани основни задаци истраживања. Имајући у виду да квалитативне и квантитативне карактеристике екстраката и њихове биолошке активности зависе од примењеног поступка екстракције, биљне врсте, али и биљног органа унутар исте врсте, циљеви докторске дисертације били су да се утврди утицај класичне и савремених метода екстракције на биолошки потенцијал и хемијски састав екстраката различитих врста врба, да се утврде разлике у антиоксидантној активности и садржају активних компонената између екстраката коре и екстраката листа исте врсте врбе, као и да се утврде разлике у антиоксидантном потенцијалу и садржају секундарних метаболита од фармаколошког значаја међу екстрактима различитих врста врба чије се природно станиште налази на територији Републике Србије. Хипотезе су адекватно

постављене у складу са циљевима истраживања и јасно су формулисане.

Комисија је мишљења да су циљеви истраживања и хипотезе јасно и прецизно наведени, те у потпуности усклађени са формулацијама наведеним у пријави теме докторске дисертације.

У поглављу **Експериментални део** детаљно су изнесени и описани материјал и методе употребљени у истраживању. У делу биљног материјала наведени су испитивани представници рода *Salix*. Прецизно су описани поступци екстракције, спектрофотометријске методе коришћене за одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја и антиоксидантне активности. Детаљно су описани параметри за валидацију методе високоефикасне течне хроматографије за одређивање хлорогенске киселине (5-CQA) у добијеним екстрактима. Такође, прецизно су описане методе употребљене за детаљну хемијску карактеризацију. Методом *in silico* молекуларног докинга испитан је инхибиторни потенцијал састојака екстраката према ензимима циклооксигеназе (COX-1 и COX-2) и ацетилхолинестерази. Методе примењене за статистичку обраду података наведене су на крају поглавља.

Комисија сматра да су изабране методе истраживања адекватне и омогућавају добијање валидних научних резултата у складу са постављеним циљевима дисертације. Примењене методе су описане јасно и детаљно, чиме је у потпуности омогућена поновљивост експеримената.

Поглавље **Резултати и дискусија резултата** је подељено у осам целина, садржи 56 графикона, 8 табела и 11 слика. Резултати и њихово тумачење приказани су на прегледан и методолошки разумљив начин. На почетку поглавља приказани су резултати ефикасности екстракције коре и листа осам представника рода *Salix* применом класичног и савремених поступака екстракције. Наредна целина обухвата резултате антиоксидантног потенцијала добијених екстраката, који је испитан преко способности неутрализације 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) и хидроксил (ОН) радикала. У следеће две целине приказани су резултати садржаја укупних фенола и флавоноида у екстрактима коре и листа различитих врста рода *Salix*. Наредна целина је посвећена валидацији аналитичке методе за одређивање садржаја хлорогенске киселине (5-CQA) у екстрактима врбе. У наредној целини приказани су резултати детаљне хемијске карактеризације добијених екстраката. Детектовани су и квантификовани салицин, гална, хлорогенска, *p*-хидроксибензојева, ванилинска, сиригинска, кафена, *p*-кумаринска и *trans*-циметна киселина, као и флавоноидна једињења епикатехин, рутин, кверцетин и нарингенин. У последње две целине дати су резултати *in silico* молекуларног докинга којим је испитан инхибиторни потенцијал компонената екстраката коре и листа врба према ензимима циклооксигеназе (COX-1 и COX-2) и ацетилхолинестерази.

Комисија сматра да су резултати приказани систематично и прегледно, логичним редоследом, свеобухватни су и јасни за интерпретацију. Дискусија добијених резултата је исцрпна, научно утемељена и уверљива, написана на начин који указује на добро познавање проучаване проблематике.

У поглављу **Закључак**, на основу добијених резултата и дискусије изведени су јасни и концизни научно засновани и поуздани закључци који одговарају постављеном циљу дисертације.

Комисија сматра да су закључци логично изведени из резултата истраживања, јасно су формулисани и прегледно приказани, у сагласности са постављеним циљевима и хипотезама.

Поглавље **Литература** садржи списак 156 литературних навода цитираних на правилан начин. Избор референци је актуелан и примерен тематици која је предмет докторске дисертације.

Комисија сматра да су литературни наводи актуелни и адекватно одабрани.

Комисија позитивно оцењује све делове докторске дисертације

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.

Рад објављен у међународном научном часопису – **M23**

Grujić Letić N, Rakić B, Šefer E, Rakić D, Nedeljković I, Kladar N, Božin B. Determination of 5-caffeoylquinic acid (5-cqa) as one of the major classes of chlorogenic acid in commercial tea and coffee samples (in press). *Vojnosanitetski preglad. Vojnosanit Pregl* 2015; 72(11): 1018–1023.

Саопштење са међународног скупа штампано у целини – **M33**

Šefer E, Grujić-Letić N. Extraction and chemical characterization of purple willow (*Salix purpurea* L.). 3. International Congress 'Food Technology, Quality and Safety', Novi Sad, 25-27 October 2016, pp 464-467.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу – **M34**

Gligorić E, Grujić-Letić N. *Salix amplexicaulis* Bory – a novel source of bioactive compounds. Emerging Trends in Natural Product Biotechnology, Dortmund, Germany, 20-21 September 2018, p 55.

Šefer E, Grujić-Letić N. Biological potential of species from the genus *Salix*. The International Bioscience Conference and the 6th International PSU – UNS Bioscience Conference IBSC 2016, Novi Sad, Serbia, 19-21 September 2016, p 188.

Šefer E, Grujić-Letić N, Božin B, Anačkov G, Kladar N. *Salix caprea* L. – A natural source of phenolic compounds. International Symposium: Natural products and drug discovery – future perspectives, Vienna, Austria, 13-14 November 2014.

Šefer E, Grujić Letić N, Kladar N, Anačkov G, Božin B. Influence of different extraction conditions on total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salix caprea* L. 5. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants (CIPAM), Zarzis, Tunisia, 17-20 March 2014.

Šefer E, Grujić N, Kladar N, Anačkov G, Božin B. *Salix rosmarinifolia*, Salicaceae - a potential novel source for isolation of salicylic acid and its derivatives. 11th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasina Lake, Serbia, 13-16 June 2013, p 89-90.

Grujić N, Šefer E, Kladar N, Božin B. Content of chlorogenic acid in the commercial coffee samples present on the Serbian market. 11th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasina Lake, Serbia, 13-16 June 2013, p 80.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу резултата истраживања изведени су закључци да услови (време екстракције, поларност растварача и степен уситњености), као и техника екстракције показују значајан утицај на укупан принос екстракције, антиоксидативну активност и садржај укупних фенолних и флавоноидних једињења у екстрактима коре и листа осам представника рода *Salix*. Класична метода мацерације 70% етанолом (v/v) била је погоднија од ултразвучне и микроталасне за добијање екстраката са јачим антиоксидативним потенцијалом према DPPH радикалу код готово свих испитиваних *Salix* врста, док су јачу инхибицију ОН радикала испољили екстракти добијени ултразвучном и микроталасном методом у односу на класичну мацерацију код свих анализираних врста врба. Развијена је брза и поуздана аналитичка метода одређивања садржаја хлорогенске киселине (5-CQA) у биљним екстрактима и показала је високу селективност, линеарност, тачност, прецизност, поновљивост и постојаност. Испитивањем садржаја 5-CQA у одабраним екстрактима врба може се закључити да је највећа количина одређена у ултразвучном екстракту листе врсте *S. triandra*, док је најмања у микроталасном екстракту коре исте врсте. У свим екстрактима испитиваних врста врба идентификован је и квантификован широк спектар фенолних једињења. Присутне фенолне киселине биле су гална, хлорогенска, *p*-хидроксибензојева, ванилинска, сиригинска, кафена, *p*-

кумаринска и *trans*-циметна киселина, флавоноидна једињења епикатехин, рутин, кверцетин и нарингенин, као и салицилни гликозид – салицин. Хемијски састав и садржај секундарних метаболита у различитим врстама врба варирао је у зависности од примењене технике екстракције. Из сваке анализираних врсте већи број појединачних компоненти у највишој концентрацији изолован је микроталасном и ултразвучном екстракцијом у поређењу са мацерацијом етанолом. Утврђене су разлике у биолошкој активности између екстраката коре и екстраката листа исте врсте врбе. Антиоксидантно деловање екстраката коре и листа зависило је од врсте радикала коју су неутралисали. Код већине *Salix* врста јачи антиоксидантни потенцијал према DPPH радикалу испољили су екстракти коре, док су код врста *S. amplexicaulis* (2014) и *S. triandra* то били екстракти листа. Екстракти листа врста *S. alba*, *S. amplexicaulis* (2013, 2014) и *S. babylonica* инхибисали су ОН радикале у већој мери него екстракти коре истих врста, док су код врста *S. eleagnos*, *S. fragilis*, *S. purpurea* и *S. triandra* доминантнији били екстракти коре. Утврђене су разлике у садржају активних састојака између екстраката коре и екстраката листа исте врсте врбе. Већи садржај појединачних једињења у екстрактима коре или листа зависио је од саме врсте врбе. Компоненте присутне у већој количини у листу него у кори у свим испитиваним врстама рода *Salix* биле су рутин, а са изузетком врсте *S. babylonica* и хлорогенска киселина. У кори врста у којима је детектована, концентрација *p*-хидроксибензојеве киселине и епикатехина (са изузетком *S. purpurea*) била је већа него у листу. Утврђене су разлике у антиоксидантној активности и садржају секундарних метаболита од фармаколошког значаја код екстраката различитих врста врба. Способност инхибиције DPPH радикала међу екстрактима различитих врста опадала је редоследом: *S. alba*>*S. triandra*>*S. eleagnos*>*S. amplexicaulis* (2013) > *S. babylonica*>*S. amplexicaulis* (2014) >*S. purpurea*>*S. fragilis*. Потенцијал екстраката различитих врста да неутралишу ОН радикале смањивао се редоследом: *S. alba*>*S. amplexicaulis* (2014) >*S. fragilis*>*S. purpurea*>*S. amplexicaulis* (2013) >*S. triandra* >*S. babylonica*>*S. eleagnos*. У погледу хемијског састава најразноврснија врста била је *S. fragilis*. У поменутој врсти садржај галне, хлорогенске, ванилинске и *trans*-циметне киселине био је највећи у поређењу са осталим анализираним врстама рода *Salix*. Концентрација *p*-хидроксибензојеве, *p*-кумаринске киселине, кверцетина и салицина била је највиша у врсти *S. amplexicaulis* (2014), док је епикатехина била у *S. amplexicaulis* (2013). У врсти *S. purpurea* количина кафеине киселине и нарингенина била је већа у односу на остале врсте врба. Садржај рутине је био највећи у врсти *S. eleagnos*, а сирингинске киселине у *S. alba*. *In silico* методом молекуларног докинга утврђена је антиинфламаторна активност екстраката коре и листа врба и главне компоненте одговорне за инхибицију изоензима циклооксигеназе. Флавоноидне компоненте кверцетин, нарингенин и епикатехин, као и хлорогенска киселина међу фенолкарбонским киселинама, остварују најниже енергије везивања са COX-1 и COX-2, указујући на јак инхибиторни потенцијал претходно наведених једињења. Резултати анализе добијени методом молекуларног докинга показали су да доминантне компоненте екстраката коре и листа врба поседују инхибиторну активност према ензиму ацетилхолинестерази. Епикатехин, салицин и хлорогенска киселина остварују низ јаких водоничних веза и хидрофобних интеракција са значајним аминокиселинским резидуима на активном месту ацетилхолинестеразе, чиме се може објаснити потентност ових једињења.

Комисија сматра да су формулисани закључци логично 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 Емилија Глигорић, маг. фарм., је у потпуности успешно спровела истраживања која су била предвиђена планом у пријави теме докторске дисертације. Добијени резултати истраживања су јасно и систематично приказани, логичним редоследом. Дискусија је заснована на добром познавању истраживане научне области. Добијени резултати су тумачени у складу са релевантним литературним наводима и повезани су у целину са теоријским поставкама рада.

Начин приказа и тумачења резултата истраживања комисија оцењује позитивном оценом.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ 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
Дисертација је написана у потпуности у складу са предложеним испитивањима и образложењем наведеним у пријави теме.
2. Да ли дисертација садржи све битне елементе
Дисертација садржи све битне елементе оригиналног научног рада неопходне за разумевање обрађене теме и добијених резултата.
3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци
У оквиру докторске дисертације урађена је хемијска анализа осам представника рода <i>Salix</i> , од којих је већина по први пут окарактерисана у погледу хемијског састава и биолошког потенцијала. Екстракти коре и листа различитих врста врба припремљени су методама екстракције које нису раније примењиване код ових врста. Испитиване врсте су показале присуство широког спектра фенолних компонената. Добијени резултати указују на могућност експлоатације врста врба које нису у комерцијалној употреби као лековитих сировина за изоловање антиоксиданаса и фармаколошки активних супстанци. Додатно, утврђено је да осим коре, и лист, који се уобичајено не користи, представља богат извор салицина, фенолних киселина и флавоноидних једињења који су главни носиоци антиоксидантног, антиинфламаторног и антихолинестеразног деловања, чиме се отвара могућност његове широке примене у фармацеутској индустрији.
4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања
Комисија није уочила недостатке који би могли утицати на резултате истраживања.
X ПРЕДЛОГ:
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
- да се докторска дисертација под насловом Биолошки потенцијал и хемијска анализа врста рода <i>Salix</i> L. (<i>Salicaceae</i>) са територије Републике Србије прихвати, а кандидату маг. фарм. Емилији Глигорић одобри одбрана

У Новом Саду, 04.10.2018.

Чланови комисије:

Др Ружица Игић, редовни професор, Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду, председник комисије

Др Бранислава Срђеновић Чонић, ванредни професор, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду, члан

Др Љиља Торовић, ванредни професор, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду, члан