

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>28. 03. 2017., Наставно-научно веће Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са назнаком 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 Горан Аначков, ванредни професор, Ботаника, 01. 12. 2014., Природно - математички факултет, Универзитета у Новом Саду</p> <p>2. др Бранислава Срђеновић Чонић, доцент, Фармација (Токсиколошка хемија), 14. 04. 2011., Медицински факултет, Универзитета у Новом Саду</p> <p>3. др Јасминка Мрђановић, научни сарадник, Природно-математичке науке - биологија, 12. 06. 2013., Институт за онкологију Војводине, Медицински факултет, Универзитета у Новом Саду</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме:</p> <p>Небојша, Властимир, Кладар</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава:</p> <p>24. 10. 1987., Загреб, Република Хрватска</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер стечени стручни назив</p> <p>Медицински факултет, Универзитета у Новом Саду, интегрисане студије фармације, магистар фармације</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</p> <p>2011, Докторске академске студије клиничке медицине</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:</p> <p>/</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:</p> <p>/</p>

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Биолошко-хемијска карактеризација врста рода *Hypericum* L. (Hypericaceae) централног дела Балканског полуострва и типификација чајева на бази кантариона

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација маг. фарм. Небојше Кладара садржи поглавља:

1. Увод (стр. 1-3)
2. Хипотезе и циљеви истраживања (стр. 4-6)
3. Општи део (стр. 7-24)
4. Материјал и методе (стр. 25-33)
5. Резултати и дискусија (стр. 34-163)
6. Закључак (стр. 164-167)
7. Литература (стр. 168-178)
8. Прилози (стр. 179-274)

Дисертација је написана на 274 стране, А4 формата, садржи 103 слике, 38 табела и 289 литературних навода. На почетку докторске дисертације дата је кључна документација са изводом на српском и енглеском језику.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Поглавље **Увод** указује на бројност представника рода *Hypericum* и глобално широки укупни ареал рода. Сумирајући податке о присуству секундарних метаболита одговорних за биолошки потенцијал кантариона (*Hypericum perforatum*), јединог званичног биолошког извора дроге *Hyperici herba*, поставља се питање могућности примене и појединих других таксона истоименог рода у фитотерапији за сличне или нове терапијске индикације. Додатно се указује на чињеницу да велики број таксона није окарактерисан како у погледу хемијског састава, тако и биолошког потенцијала, те с обзиром на заступљеност препарата природног порекла у модерној медицинској пракси, потенцијално представља богат извор нових сировина. Такође, наглашава се варијабилност синтезе секундарних метаболита услед различитости абиотичких еколошких фактора присутних на станишту, али и ризик од прикупљања представника морфолошки сличних званичном биолошком извору услед недовољне обучености сакупљача лековитог биља, што као последицу може имати значајан утицај на хемијски квалитет дроге, односно биолошки потенцијал.

У поглављу **Хипотезе и циљеви истраживања** јасно су дефинисани основни задаци истраживања. Узимајући у обзир велики биодиверзитет рода *Hypericum* на територији централног дела Балканског полуострва, за циљеве докторске дисертације постављени су хемијска карактеризација и испитивање биолошког потенцијала различитих представника рода, као и монокомпонентних чајева на бази кантариона комерцијално доступних на тржишту земаља распрострањених у наведеној географској регији. Такође, пажња је усмерена и на варијабилност испитиваних параметара у зависности од географског порекла прикупљеног биљног материјала, односно у зависности од фазе онтогенетског развоја биљке. Додатно, један од циљева био је и морфолошка контрола квалитета монокомпонентних чајева на бази кантариона, као и одређивање степена уситњености. У складу са тим, 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.

Поглавље **Општи део** се састоји из шест целина. У првој целини описане су морфолошке карактеристике представника рода *Hypericum* уз осврт на таксономску класификацију унутар рода. Наредне три целине су посвећене најбоље изученом представнику рода (*H. perforatum*) и дроги (*Hyperici herba*), са акцентом постављеним на опис биолошког извора и дроге, активне принципе, индикације традиционалне и конвенционалне медицине, односно безбедност примене. Пета целина литературно обрађује различите класе секундарних метаболита присутне у таксонима рода *Hypericum*, посебно се осврћући на поједина једињења за које се сматра да су носиоци биолошких активности. У последњој целини дат је преглед досадашњих испитивања биолошког потенцијала

различитих представника рода. Притом, посебна пажња је усмерена на антиоксидантни, антиинфламаторни, антимикробни, антипролиферативни и механизме деловања у терапији депресије. Такође, изнесена су и претходна сазнања о способности екстраката до сада испитаних таксона рода *Hypericum* да инхибишу биолошки значајне ензиме, са циљем потенцијалне примене у терапији обољења као што су Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест, дијабетес и депресија.

У поглављу **Материјал и методе** детаљно су изнесени и описани материјал и методе употребљени у истраживању. На почетку поглавља дат је детаљан списак сакупљених таксона рода *Hypericum* и комерцијално доступних монокомпонентних чајева на бази кантариона коришћених у истраживању. Прецизно су описане методе припреме екстраката као и методе употребљене за прелиминарну и детаљну хемијску карактеризацију (високоефикасна течна хроматографија). Биолошки потенцијал екстраката је испитан спектрофотометријским и спектрофлуориметријским методама, док је морфолошка контрола квалитета чајних мешавина и одређивање степена уситњености извршена помоћу доступних дихотомих кључева за детерминацију представника рода *Hypericum*, односно прописаних фармакопејских метода. Све униваријантне и мултиваријантне (анализа главних компоненти, канонијска дискриминантна анализа, коресподентна анализа, кластер анализа, као и тестови варијансе MANOVA) методе примењене за статистичку обраду добијених података, као и употребљени софтверски пакети су наведени у последњој целини поглавља. Изабране методе су адекватне и сагласне са постављеним циљевима, те омогућавају добијање валидних научних резултата.

Поглавље **Резултати и дискусија** је подељено у четири целине, садржи 34 табеле и 97 слика. Приказ и тумачење резултата дати су на прегледан и методолошки разумљив начин. На почетку поглавља приказани су резултати прелиминарне хемијске карактеризације (садржај укупних фенола и флавоноида) екстраката анализираних узорака различитих представника рода *Hypericum* и монокомпонентних чајева на бази кантариона. Наредна целина је посвећена детаљној хемијској карактеризацији припремљених екстраката са циљем квантификације хиперицина, хиперфорина, аментофлавона, кверцетина, рутина, апигенина, нарингенина, епикатехина, галне, хлорогенске, кафење, ферулне и *p*-хидроксibenзојеве киселине. Добијени резултати су доказали присуство наведених секундарних метаболита у узорцима монокомпонентних чајева на бази кантариона и узорцима таксона рода *Hypericum* прикупљеним за време цветања, али и тренд њихове акумулације током онтогенетског развоја биљке. Примењене униваријантне и мултиваријантне статистичке технике су показале дистрибуцију квантификованих једињења у испитаним таксонима, потврдиле хипотезу о варијабилности садржаја узроковану абиотичким факторима присутним на станишту и дали хемотаксономски значај истраживању. Тематика следеће велике целине је била испитивање билошког потенцијала екстраката представника рода *Hypericum* и обухватила је испитивање антиоксидантног потенцијала, потенцијала инхибиције биолошки значајних ензима и антипролиферативног ефекта. Антиоксидантни потенцијал је испитан преко способности неутрализације слободних радикала (DPPH, OH и NO радикал), инхибиције процеса липидне пероксидације и FRAP-теста. Способност инхибиције ензимске активности је обухватила ензиме есенцијалне у патофизиологији и терапији Алцхајмерове болести (ацетилхолинестераза), депресије (моноаминоксидазе А и Б) и дијабетеса (α -амилаза и α -глукозидаза). Резултати добијени испитивањем антиоксидантног потенцијала и потенцијала инхибиције биолошки значајних ензима су обрађени методама униваријантне и мултиваријантне статистичке анализе показујући варијабилност уочених активности зависну од географског порекла узорака како испитиваних таксона, тако и монокомпонентних чајева на бази кантариона. Антипролиферативни потенцијал одабраних екстраката таксона рода *Hypericum* је одређен на једној здравој ћелијској линији (MRC-5) и три туморске ћелијске линије (HeLa, Hs294T, HT-29) кроз монотретман екстрактима и котретман са блеомицином, при чему је забележено повећање антитуморске активности и селективности котретмана. У последњој целини представљени су резултати морфолошке контроле састава комерцијално доступних монокомпонентних чајева на бази кантариона и одређивања степена уситњености. Добијени резултати су потврдили хипотезу да комерцијално доступни чајеви садрже биолошке изворе припаднике рода *Hypericum* различите од *H. perforatum* subsp. *perforatum*, те да су различито уситњени, значајно одступајући од прописа наведених у фармакопејама.

У поглављу **Закључак**, на основу добијених резултата и дискусије изведени су јасни и концизни,

научно засновани и поуздани закључци који одговарају постављеном циљу дисертације.

Поглавље **Литература** садржи списак 289 литературних навода цитираних на правилан начин. Избор референци је актуелан и примерен тематици која је предмет ове дисертације.

У поглављу **Прилози** дати су додатни подаци који поткрепују садржај поглавља Општи део и Материјал и методе, као и резултате наведене у поглављу 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

Истраживања која су урађена у оквиру докторске дисертације, верификована су у следећим публикацијама:

Поглавље у монографији од међународног значаја - **M14**

Kladar N, Srđenić B, Grujić N, Rat M, Gavarić N, Anačkov G, et al. St. John's Wort (*Hypericum* spp.) – Relation between the biological source and medical properties. In: Davis H, editor. *Hypericum: Botanical sources, medical properties and health effects*: Nova Science Publishers; 2015. p. 53-80.

Радови објављени у истакнутом међународном часопису - **M22**

Kladar N, Srđenić B, Grujić N, Bokić B, Rat M, Anačkov G, et al. Ecologically and ontogenetically induced variations in phenolic compounds and biological activities of *Hypericum maculatum* subsp. *maculatum*, Hypericaceae. *Brazilian Journal of Botany*. 2015;38(4):703-15.

Božin B, Kladar N, Grujić N, Anačkov G, Samojlik I, Gavarić N, et al. Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's wort species (*Hypericum* spp., Hypericaceae) from the Central Balkans. *Molecules*. 2013;18(10):11733-50.

Рад у водећем часопису националног значаја - **M51**

Kladar N, Rat M, Gavarić N, Srdjenovic B, Mrđanovic J, Anačkov G, et al. Chemical characterization and chemotaxonomy of *Hypericum hirsutum* L. 1753 from Vojvodina (Serbia). *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. 2016;131(2):167-75.

Саопштења са међународног скупа штампана у изводу - **M34**

Kladar N, Gavarić N, Rat M, Janjić Đ, Dugonjić J, Anačkov G, et al. Distribution of species of genus *Hypericum* L. 1753 (Hypericaceae) in Vojvodina (Serbia). *The International Bioscience Conference*; 2016; Novi Sad. Book of abstracts on CD.

Kladar N, Rat M, Srđenić Čonić B, Gavarić N, Anačkov G, Božin B. Quality control of *Hyperici herba* samples from Republic of Serbia. *Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih područja*; 2016; Kopaonik. Book of abstracts. p91.

Kladar N, Gavarić N, Srđenić Čonić B, Rat M, Janjić Đ, Anačkov G, et al. Seasonal variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum perforatum* subsp. *perforatum*. *Simpozijum biologa i ekologe Republike Srpske*; 2015; Banja Luka. Book of abstracts on CD.

Kladar N, Srđenić Čonić B, Grujić N, Gavarić N, Bogavac M, Anačkov G, et al. Inhibition of acetylcholinesterase by six *Hypericum* species from Balkan Peninsula. *Congress of the International Society for Ethnopharmacology*; 2015; Petra, Jordan. Book of abstracts. p26-27.

Božin B, Kladar N, Grujić N, Srđenić Čonić B, Rat M, Gavarić N, et al. Importance of Crude Drug Quality Control - Case of *Hyperici herba* from Balkan Peninsula. *Congress of the International Society for Ethnopharmacology*; 2015; Petra, Jordan. Book of abstracts. p57.

Kladar N, Grujić N, Srđenić Čonić B, Gligorić E, Anačkov G, Božin B. Impact of origin on chemical composition and biological potential of *Hyperici herba* (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae)

distributed on market of Balkan peninsula. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants; 2014; Zarzis, Tunis. Book of abstracts on CD.

Kladar N, Đurendić Brenesel M, Anačkov G, Srđenović Čonić B, Božin B. Do analytical parameters affect the GC-MS separation and quantification of compounds of essential oils - case of *Hypericum hirsutum*? International Symposium on Essential Oils; 2014; Istanbul, 2014. Book of abstracts. p199.

Kladar N, Srđenović Čonić B, Grujić N, Gligorić E, Anačkov G, Božin B. Quality of herbal drugs in relation to the origin of plant material - the example of St. Johns wort (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae). Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih područja; 2013; Vlasinsko jezero. Book of abstracts. p83.

Саопштења са скупа националног значаја штампана у изводу - **M64**

Kladar N, Rat M, Gavarić N, Srđenović Čonić B, Janjić Đ, Anačkov G, et al. Chemical characterization of water alcoholic extracts of *Hypericum hirsutum* from Vojvodina. Botanički simpozijum: Treći vek botanike u Vojvodini; 2016; Novi Sad.

Kladar N, Srđenović Čonić B, Grujić N, Anačkov G, Božin B. Quality of commercial samples of St John's wort related to the origin of plant material. InterRegioSci; 2014; Novi Sad. Book of abstracts. p123.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Резултати прелиминарне и детаљне хемијске карактеризације испитиваних таксона рода *Hypericum* су показали значајне варијације у погледу садржаја секундарних метаболита зависне од географског порекла биљног материјала употребљеног за припрему екстраката, указујући на значај абиотичких фактора присутних на станишту биолошког извора за квалитет дроге. Уочене су сличности хемијских профила званичног биолошког извора дроге *Hyperici herba* (*Hypericum perforatum* subsp. *perforatum*) и *H. maculatum* subsp. *maculatum*, *H. maculatum* subsp. *immaculatum* и *H. hirsutum*, што, узимајући у обзир широко распрострањење и велике и очуване популације ових таксона у природи, отвара могућност њихове експлоатације у економске сврхе. Такође, неопходно је напоменути да су висок садржај хиперицина и аментофлавона детектовани у *H. barbatum*, хиперфорина и рутина у *H. richeri* subsp. *grisebachii*, кверцетина у *H. androsaemum* и *H. linarioides*, односно рутина у *H. montanum*, што их потенцијално чини погодним за екстракцију наведених активних принципа. Испитивање акумулације секундарних метаболита током онтогенетског развоја представника рода *Hypericum* је показало да у већини таксона главни активни принципи свој максимални садржај достижу током периода цветања, са изузетком фенолних киселина које се највише акумулирају у периоду пре цветања.

Испитивање антиоксидантног потенцијала и потенцијала инхибиције биолошки значајних ензима је такође показало варијације забележених активности зависне од географског порекла биљног материјала. Уочен је снажан антиоксидантни потенцијал у FRAP-тесту, као и снажна способност инхибиције DPPH и NO радикала, упоредива са активношћу комерцијалних антиоксиданаса, док је способност неутрализације OH радикала и процеса липидне пероксидације оцењена као умерена, односно слаба. Екстракти узорака испитаних таксона су показали знатно снажнију способност инхибиције активности моноаминоксидазе А, упоредиву са потенцијалом моклобемида, него што је то случај са моноаминоксидазом Б. Антихолинестеразна активност испитаних екстраката је у поређењу са галантамином оцењена као умерена до слаба. Вишеструко снажнији потенцијал инхибиције α -глукозидазе (снажнији од акарбозе) је уочен, за разлику од антиамилазног потенцијала који је оцењен као слаб. Одређивање антипролиферативне активности екстраката испитиваних таксона рода *Hypericum* је указало на умерену до слабу активност праћену са ниском селективношћу према туморским ћелијама. Међутим котретман ћелијских линија са блеомицином је указао на пораст цитотоксичног ефекта и селективности према туморским ћелијским линијама, нарочито према ћелијама карцинома цервикса (HeLa) и меланома (Hs294T).

Резултати прелиминарне и детаљне хемијске карактеризације екстраката узорака монокомпонентних

<p>чајева на бази кантариона су указали на велику варијабилност садржаја секундарних метаболита. Резултати мултиваријантне статистичке анализе су показали различитост састава чајева са аспекта биолошких извора употребљених за њихову израду, што је потврђено морфолошком анализом састава чајева. Додатно, уочен је различит степен уситњености узорака што последично има утицај на количину екстрахованих активних принципа приликом припреме препарата.</p>
<p>VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.</p>
<p>Кандидат Небојша Кладар, маг. фарм., је у потпуности успешно обавио истраживања која су била предвиђена планом у пријави теме докторске дисертације. Добијени резултати истраживања су систематично и прегледно приказани, логичним редоследом. Дискусија је заснована на добром познавању истраживане научне области. Интерпретирани резултати и тумачења су у складу са релевантним литературним наводима, повезани су у целину са теоријским поставкама рада. Комисија начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивном оценом.</p>
<p>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:</p>
<p>1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме</p> <p>Дисертација је написана у потпуности у складу са предложеним испитивањима и образложењем наведеним у пријави теме.</p>
<p>2. Да ли дисертација садржи све битне елементе</p> <p>Дисертација садржи све битне елементе оригиналног научног рада неопходне за разумевање обрађене теме и добијених резултата.</p>
<p>3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци</p> <p>Хемијска карактеризација 32 таксона рода <i>Hypericum</i> укључујући већи број узорака истог таксона са различитих локалитета (укупно 441 анализиран узорак) представља изузетан допринос испитивањима већег броја таксона овог, самим тим још увек недовољно истраженог рода. Такође, већина испитаних таксона претходно није била евалуирана кроз поједине тестове одређивања биолошког потенцијала примењене у овом истраживању. Као резултат идентификовани су таксони који потенцијално могу да се употребе као заменски биолошки извори дроге <i>Hyperici herba</i>, односно таксони са вишим садржајем активних принципа и могућношћу експлоатације као сировине за фармацеутску, односно хемијску индустрију. Испитани екстракти су показали снажну способност инхибиције моноаминооксидазе А и α-глукозидазе, као и повећање антипролиферативног ефекта у котретману ћелијских линија са блеомицином, отварајући поље нових терапијских потенцијала за испитивање припадника рода <i>Hypericum</i>. Евалуација узорака монокомпонентних чајева на бази кантариона је указала на значајност контроле квалитета, како хемијско-технолошке, тако и морфолошке, и то примарно са аспекта идентификације биолошког извора употребљеног за израду чаја.</p>
<p>4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања</p> <p>Недостаци дисертације нису уочени.</p>

X ПРЕДЛОГ:
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
- да се докторска дисертација под називом „Биолошко-хемијска карактеризација врста рода <i>Hupericum</i> L. (Hupericaceae) централног дела Балканског полуострва и типификација чајева на бази кантариона“ прихвати, а кандидату маг. фарм. Небојши Кладару одобри одбрана.

датум: 17. 05. 2017.

Чланови Комисије:

1. Др Горан Аначков, председник
ванредни професор, Природно-математички факултет,
Универзитета у Новом Саду

2. Др Бранислава Срђеновић Чонић, члан
доцент, Медицински факултет, Универзитета у Новом
Саду

3. Др Јасминка Мрђановић, члан
научни сарадник, Институт за онкологију Војводине,
Медицински факултет, Универзитета у Новом Саду

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.

ИЗВЕШТАЈ СЕ ПОДНОСИ У 10 ПРИМЕРАКА

(два извештаја са оригиналним потписима)

КАНДИДАТ ЈЕ ОБАВЕЗАН ДА ДОСТАВИ ИЗВЕШТАЈ И У ЕЛЕКТОРНСКОЈ ФОРМИ

У PDF формату на ЦД-у

НАПОМЕНА: Уз извештаје студенти морају да предају и попуњен образац бр. 7 у два примерка и на ЦД-у у PDF формату