

Образац -3

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



РЕПУБЛИКА СРПСКА
УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
Број: 19-957/19
Датум: 18.04.2019 год.
БАЊА ЛУКА

IZVJEŠTAJ
o ocjeni uradene doktorske disertacije

I PODACI O KOMISIJI

- 1) Nastavno-naučno vijeće Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci je na 210. sjednici održanoj 13.03.2019. godine donijelo Odluku broj 19/3.591/19 kojom je imenovalo Komisiju za pregled, ocjenu i odbranu uradene doktorske disertacije. Komisija je dužna da u roku od 60 dana napiše Izvještaj o ocjeni uradene doktorske disertacije "Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.", kandidatkinje mr Elvise Hodžić
- 2) Komisija:
 - Dr Biljana Kukavica, redovni profesor, uža naučna oblast *Biohemija i molekularna biologija*, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **predsjednik**
 - Dr Semira Galijašević, vanredni profesor, uža naučna oblast *Opšta hemija*, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu i vanredni profesor, uža naučna oblast *Medicinska hemija i biohemija*, Sarajevo School of Science and Technology, Medical School, mentor, **član**
 - Dr Milica Balaban, vanredni profesor, uža naučna oblast *Organjska hemija*, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, mentor, **član**
 - Dr Halid Makić, vanredni profesor, uža naučna oblast *Analitička hemija* i uža naučna oblast *Biohemija*, Biotehnički fakultet Univerziteta u Bihaću, **član**
 - Dr Saša Zeljković, vanredni profesor, uža naučna oblast *Neorganska i nuklearna hemija*, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **član**
- 1) Navesti datum i organ koji je imenovao komisiju;
- 2) Navesti sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, naučno-nastavnog zvanja, naziva uža naučne oblasti za koju je izabran u zvanje i naziva univerziteta/fakulteta/instituta na kojem je član komisije zaposlen.

II PODACI O KANDIDATU

- 1) Elvisa, Irfan, Hodžić
 - 2) 31.01.1984. godine, Bihać, Bosna i Hercegovina
 - 3) Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Odsjek za hemiju, magistar hemijskih nauka-smjer Analitička hemija
 - 4) Prirodno-matematički fakultet, „Mehanističke i kompjuterske studije reaktivnosti laktoperoksidaznog sistema“, Hemijske nauke, 03.07.2012. godine
 - 5) Hemijske nauke
 - 6) Postupak za sticanje naučnog stepena doktora nauka započet je 2015. godine, prema odredbama Člana 148. Zakona o visokom obrazovanju, *Studijski program hemija*
- 1) Ime, ime jednog roditelja, prezime;
2) Datum rođenja, opština, država;
3) Naziv univerziteta i fakulteta i naziv studijskog programa akademskih studija II ciklusa, odnosno

- poslijediplomskih magistarskih studija i stečeno stručno/naučno zvanje;
4) Fakultet, naziv magistarske teze, naučna oblast i datum odbrane magistarskog rada;
5) Naučna oblast iz koje je stečeno naučno zvanje magistra nauka/akademsko zvanje mastera;
6) Godina upisa na doktorske studije i naziv studijskog programa.

III UVODNI DIO OCJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

- 1) „Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.”
2) 02.03.2016. Senat Univerziteta u Banjoj Luci (Odluka broj: 02/04-3.536-81/16)
3) Poglavlje „UVOD” je napisano na dvije stranice (str. 1 i 2) i sadrži opis melatonina, kao i kratak osvrt na njegovu ulogu u životnom svijetu i na značaj u regulisanju skoro svih faza rasta i razvoja biljaka i njegovu uključenost u odbranu biljaka od različitih vrsta biotičkog i abiotičkog stresa.
Poglavlje „CILJ ISTRAŽIVANJA” je napisan na jednoj stranici (str. 3) i sadrži jasno formulisane ciljeve istraživanja.
Kandidatkinja je u poglavlju „PREGLED LITERATURE” (33 stranice; str. 6-39), jasno opisala karakteristike melatonina (strukturu, mehanizam djelovanja) (str. 6-8), otkriće melatonina u biljnim tkivima i njegove koncentracije u pojedinim biljnim organima (str. 9-15). Predstavljen je sveobuhvatan literarni pregled o uticaju teških metala na metabolizam biljaka, sa posebnim osvrtom na jone kadmijuma i cinka (str. 16-21), te oksidativni stres koji nastaje kao posljedica djelovanja metala na metabolizam biljaka (str. 21-22). Opisana je uloga melatonina u zaštiti biljaka od stresa (str. 23-30) i uticaj melatonina na morfološka svojstva biljaka (str. 32-34). Karakteristike dvije biljne vrste korištene u istraživanju su opisane na str. 35-39.
Poglavlje „MATERIJAL I METODE RADA” (30 stranica; str. 40-70) sadrži: opis uslova u kojima je eksperiment postavljen i uslove gajenja biljaka (str. 40-43), uzorkovanje biljaka (str. 44), navedene korištene hemikalije i reagense (str. 45), opis ekstrakcije i metode mjerjenja melatonina u biljnim tkivima tečnom hromatografijom visokih performansi sa različitim detektorima, HPLC-FLD i HPLC-DAD (str. 46-49), opis pripreme biljnog materijala mikrotalasnog digestijom i određivanje sadržaja teških metala (str. 50-56). Poglavlje materijala i metoda rada sadrži i odjeljak koji opisuje pripremu metanolnih ekstrakata, te *in vitro* testove za mjerjenje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata (str. 56-58), kako slijede: Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (Solter-Rivas i sar., 2000, str. 59), Određivanje sposobnosti redukcije ekstrakata FRAP testom (Ferric Reducing/Antioxidant Power) (Benzie i Strain, 1999, str. 60), određivanje sposobnosti redukcije Cu(II) jona (CUPRAC test) (Apak i sar., 2007, str. 61). Određivanje sadržaja ukupnih fenola spektrofotometrijski reakcijom po Folin-Ciocalteau (TPC – Total Phenolic Content) (Singleton i sar., 1999, str. 64), Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (Chang i sar., 2002, str. 64), te sposobnost heliranja teških metala (str. 66). Detaljno su opisane metode za ekstrakciju solubilnih proteina iz biljnog materijala i određivanje koncentracije proteina (str. 67), spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peroksidaza (str. 69). Dat je opis native elektroforeze koja je korištena za razdvajanje izoformi superoksid dismutaza (SOD) (str. 69). Posljednji odjeljak u poglavlju „Materijal i metode rada“ opisuje program korišten za denzitometrijsku obradu gelova sa razdvojenim SOD izoformama (TotalLAb) i program za statističku obradu dobijenih rezultata (str. 70).
Poglavlje „REZULTATI I DISKUSIJA” (55 stranica; str. 71-126) sadrži pregled dobijenih rezultata predstavljenih u tabelama i grafički. Prvi odjeljak prikazuje fizičko-hemijska svojstva zemljišta, te meterološke uslove tokom postavljanja eksperimenta (str. 71). U sljedećem odjeljku predstavljeni su rezultati o sadržaju melatonina u biljnim organima matičnjaka i valerijane dobijeni nakon mjerjenja HPLC-FLD tehnikom (str. 72-80). Određen je sadržaj teških metala u biljnim organima tehnikom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS) (str. 81-86). Prikazani su rezultati djelovanja melatonina i teških metala na morfološke karakteristike biljaka, te na sadržaj biljnih pigmenata (str. 87-96). Analiza glavnih komponenti morfometrijskih i fizioloških parametara urađena je na osnovu korelacijskih matrica (str. 97-98). U ovom poglavlju prikazani su i rezultati uticaja melatonina i teških metala na sadržaj makroelemenata u ispitivanim biljnim organima (str. 99-101), te na sadržaj fenola i flavonoida (str. 102-106). Predstavljeni su i rezultati uticaja melatonina i teških metala na sadržaj solubilnih proteina i aktivnost antioksidativnih enzima (peroksidaza i superoksid dismutaza).

u listovima i korijenu matičnjaka i valerijane (str. 107-113) i rezultati uticaja melatonina i teških metala na antioksidativnu aktivnost ekstrakata listova i korijena matičnjaka i valerijane po svim predviđenim metodama mjerjenja antioksidativne aktivnosti (str. 113-119). Određena je sposobnost biljnih ekstrakata da heliraju teške metale (Cd i Zn) (str. 121-123), te analiza glavnih komponenti praćenih hemijskih parametara (str. 123-126). Svi dobijeni rezultati su upoređeni sa relevantnim literaturnim podacima.

Poglavlje „ZAKLJUČAK“ (5 stranica; str. 127-131) sadrži pravilno i sistemski navedene zaključke ovog istraživanja, uz jasno navođenje njihovog teorijskog i praktičnog značaja za ispitivanu oblast. Poglavlje „LITERATURA“ (13 stranica; str. 132-149) sadrži 212 abecedno navedenih referenci.

4) Disertacija sadrži 147 numerisanih stranica računarski obradeno teksta, 23 tabele i 46 slika. Citirano je 212 referenci. Disertacija obuhvata sedam poglavija: Uvod, Cilj istraživanja, Pregled literature, Materijal i metode rada, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura.

1) Naslov doktorske disertacije;

2) Vrijeme i organ koji je prihvatio temu doktorske disertacije

3) Sadržaj doktorske disertacije sa straničnjem;

4) Istači osnovne podatke o doktorskoj disertaciji: obim, broj tabela, slika, šema, grafičkona, broj citirane literature i navesti poglavja.

IV UVOD I PREGLED LITERATURE

1) Znatan broj dosadašnjih istraživanja ukazao je na značaj melatonina u regulisanju skoro svih faza rasta i razvoja biljake (od klijanja sjemena do starenja listova), kao i u odbranu od različitih vrsta biotičkog i abiotičkog stresa poput suše, promjene saliniteta, ekstremno niskih ili visokih temperatura, raznih patogena i hemijskih agenasa. Kao faktori abiotičkog stresa teški metali narušavaju osnovne metaboličke procese dovodeći do anatomske, morfološke, fiziološke i biohemijskih poremećaja u biljci. Metali svoje toksično djelovanje ispoljavaju i na način da dovode do povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) koji narušavaju redoks homeostazu ćelije. Međutim, identifikacija i kvantifikacija melatonina, kao i analiza biohemijskih i morfoloških karakteristika matičnjaka i valerijane pod istovremenim uticajem teških metala i egzogenog melatonina dosada nije uradena.

U ovom radu ispitivana je uloga melatonina u prenosu signala iz životne sredine i posredovanju u odgovor biljaka na maksimalno dozvoljene koncentracije kadmijuma i cinka. U okviru rada ispitano je djelovanje egzogenog melatonina na njegov endogeni nivo u biljnim vrstama *Melissa officinalis* i *Valeriana officinalis*. Upoređeni su i odgovori biljaka na prisustvo metala određivanjem akumulacije melatonina ili promjenom aktivnosti antioksidativnih enzima u korijenu i listovima matičnjaka i valerijane. Melatonin može, pored antioksidativne uloge, stvarati kompleksne sa metalima i na taj način ispoljiti svoju zaštitnu ulogu.

2) Melatonin (*N*-acetil-5-metoksitriptamin) je indolamin izolovan 1958. godine iz govede epifize (Lerner i sar., 1958), a kasnije otkriven i u drugim organizmima kao što su bakterije, jednoćelijske i višećelijske alge, beskičmenjaci, kičmenjaci i više biljke (Gomez i sar., 2012; Tan i sar., 2012). Nakon identifikacije melatonina u biljkama 1995. godine, njegov sadržaj je izmјeren u korijenu, listu, plodovima, cvjetu i sjemenu raznog povrća, voća, žitarica i ljekovitog bilja (Korkmaz i sar., 2014), a kretao se između nekoliko pikograma do nekoliko mikrograma po gramu biljnog tkiva.

Povećana prozvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS: superoksid anjon radikal (O_2^-), singletni kisik (1O_2), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksi radikal (HO)) u biljnim ćelijama je posljedica djelovanja različitih vrsta abiotičkog i biotičkog stresa (Harb i sar., 2015). I u toku normalnog metabolizma dolazi do proizvodnje ROS, ali pod uticajem različitih vrsta stresa koncentracija ROS se povećava i dolazi do nastanka oksidativnog stresa. U biljnim ćelijama ROS nastaju u hloroplastima, mitohondrijama, peroksizomima, ekstracelularnim prostorima i mogu da dovedu do oksidativnih promjena proteina, lipida i DNK, što za posljedicu ima promjenu njihove strukture i funkcije, a što na kraju može dovesti i do smrti ćelije.

Teški metali utiču na rast i razvoj biljaka i dovode do povećane koncentracije ROS u biljnim ćelijama i tako dovode do oksidativnog stresa (Trudić i sar., 2012). Iako brojna istraživanja ukazuju na pozitivan efekat melatonina na antioksidativni kapacitet biljaka, još uvijek nije poznat tačan mehanizam. Postoji nekoliko pretpostavki koje objašnjavaju povezanost melatonina sa

antioksidativnim kapacitetom biljaka. Melatonin može direktno da uklanja ROS (Tan i sar., 1993), povećavajući antioksidativni kapacitet biljaka (Boccalandro i sar., 2011), ili može da stimuliše aktivnost enzima antioksidativne odbrane (Zhang i sar., 2014). Isto tako, melatonin poboljšava antioksidativni kapacitet biljaka povećavajući akumulaciju polifenola. Znatan broj istraživanja ukazao je na značaj melatonina u regulisanju skoro svih faza rasta i razvoja biljake (od klijanja sjemena do starenja listova), kao i obrani od različitih biotičkih i abiotičkih vrsta stresa (Byeon and Back, 2014; Zhang i sar., 2015; Shi i sar., 2015, Arnao i Hernandez-Ruiz, 2015).

Na akumulaciju i dostupnost toksičnih metala posebno utječu tip zemljišta, njegova pH vrijednost, kao i sadržaj organskih materija u zemljištu (Zeremski, 2005).

Literatura citirana u doktorskoj disertaciji a navedena u ovom dijelu izvještaja: Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y. (1958). Isolation of melatonin, a pineal factor that lightness melanocytes. *J. Am. Soc.*, 80, 2587. Gomez, F. J. V., Raba, J., Cerutti, S., Silva, M. F. (2012). Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. *Journal of Pineal Research*, 52, 349-355. Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., Reiter, R. J. (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *Journal of Experimental Botany*, 63, 577-597. Korkmaz, A., Deger, O., Yakup, C. (2014). Profiling the melatonin content in organs of the pepper plant during different growth stages. *Scientia Horticulturae*, 172, 242 – 247. Harb, A., Awad, D., Samarah, N. (2015). Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 109–116. Zeremski, T. (2005). *Određivanje sadržaja teških metala i njihovog oblika vezivanja u černozemu Vojvodine metodom sekvenčjalne ekstrakcije*. Magistarski rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. Trudić, B., Keber, M., Popović, B. M., Štajner, D., Orlović, S., Galović V. (2012). The level of oxidative stress in poplars due to heavy metal pollution in soil. *Baltic forestry*, 18, 214-227. Boccalandro, H. E., Gonzales, C. V., Wunderlin, D. A., Silva, M. F. (2011). Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, fluctuate during the day/night cycle in *Vitis vinifera* cv Malbec: evidence of its antioxidant role in fruits. *Journal of pineal research*, 51(2), 226-232. Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., Guo, Y.-D. (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experim. Botany*, 66 (3), 647-656. Shi, H., Jiang, C., Ye, T., Tan, D.X., Reiter, R.J., Zhang, H., Liu, R., Chan, Z. (2015). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.). Pers.] by exogenous melatonin. *Journal of Experimental Botany*, 66, 681–694. Byeon, Y., Back, K. (2014). An increase in melatonin in transgenic rice causes pleiotropic phenotypes, including enhanced seedling growth, delayed flowering and low grain yield. *Journal of Pineal Research*, 56, 408-414. Arnao, M. B., Hernandez-Ruiz, J. (2013). Growth conditions determine different melatonin levels in *Lupinus albus* L. *Journal of Pineal Research*, 55, 149–155.

3) U ovom radu po prvi put izvršeno je kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja melatonina u biljnim vrstama *Melissa officinalis* L i *Valeriana officinalis* L. Takođe, ispitane su i funkcije pretretmana melatoninom pri izlaganju biljaka oksidativnom stresu, tretiranjem maksimalno dozvoljenim koncentracijama kadmijuma i cinka. Pretretman melatoninom uticao je na povećanje sadržaja melatonina u odnosu na kontrolu, osim u korijenu valerijane, gdje se uočava statistički značajno smanjenje njegove koncentracije.

4) Očekivani naučni doprinos ove disertacije se odnosi na saznanja o gajenju ljekovitih biljnih vrsta na zemljištu onečišćenom toksičnim metalima, njihovom uticaju na biljnu morfologiju, te odgovor biljaka na povećani stres. Promjene u antioksidativnoj aktivnosti matičnjaka i valerijane pokazuju da melatonin u uslovima stresa izazvanog teškim metalima poboljšava tolerantnost ispitivanih biljnih vrsta na stres.

- 1) Ukratko istaći razlog zbog kojih su istraživanja preduzeta i predstaviti problem, predmet, ciljeve i hipoteze;
- 2) Na osnovu pregleda literature sažeto prikazati rezultate prethodnih istraživanja u vezi problema koji je istraživan (voditi računa da obuhvata najnovija i najznačajnija saznanja iz te oblasti kod nas i u svijetu);
- 3) Navesti doprinos teze u rješavanju izučavanog predmeta istraživanja;
- 4) Navesti očekivane naučne i pragmatične doprinose disertacije.

V MATERIJAL I METODE RADA

1) Imajući u vidu postavljene ciljeve rada primjenom odgovarajućih eksperimentalnih metoda kandidatkinja je pripremila eksperimentalnu parcelu za uzgoj odabranih biljnih vrsta matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) i valerijane (*Valeriana officinalis* L.). Eksperiment je izveden u poljskim uslovima po tzv. *split-plot* metodi u tri ponavljanja, tako da su odabrane biljke tretirane teškim

metalima, kadmijumom i cinkom, kao i melatoninom kao pretretmanom (6 ukupnih tretmana). Sjeme matičnjaka je posijano u posude za naklijavanje, prekriveno samo tankim slojem sitne zemlje i redovno zalijevano vodom i/ili vodenim rastvorom melatonina, koncentracije $100 \mu\text{M}$. Sijanje sjemena izvršeno je u rano proljeće (sredinom marta), a zasađeno sjeme je bilo na temperaturi od $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Nakon 20-25 dana od sijanja, kad su biljke dobine 4-6 para listova i dostigle visinu od 2 cm biljke matičnjaka su rasadivane na stalno mjesto u polje. Rasad valerijane dobiven je u sadnicama od mjesnog sakupljачa ljekovitog bilja. Jedan dio sadnica je držan u vodi, a drugi u vodenom rastvoru melatonina koncentracije $100 \mu\text{M}$, 48 h, na tamnom, nakon čega su biljke posadene u polje na stalno mjesto. Svi uzorci nakon uzorkovanja su osušeni zamrzavanjem na temperaturi od -55°C , 25-30 h, u liofilizatoru (VaCo 2, ZIRBUS Technology, GmbH, Germany) u laboratorijsama Biotehničkog fakulteta u Bihaću. Nakon liofilizacije uzorci su čuvani na 4°C do analize, ali ne duže od 90 dana. Sa ciljem određivanja uticaja pretretmana melatoninom i tretmana teškim metalima na morfološke karakteristike biljaka izmjerene su vrijednosti sljedećih parametara: visina biljaka, prečnik biljaka, masa svježe biljke, korijena i stabljike, masa suve biljke, korijena i stabljike i razvijenost korijena. Za mjerjenje melatonina odabrana je metoda direktnе ekstrakcije uz metanol kao ekstrakciono sredstvo. Analiza je vršena primjenom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) povezane sa DAD i FLD detektorom. Sadržaj teških metala u pojedinim biljnim organima dvije biljne vrste je izmјeren pomoću Perkin Elmer 5000 atomskog apsorpcionog spektrofotometra. Koncentracija metala je odredena plamenom tehnikom u režimu apsorpcije, u modu integracije.

Etanolni ekstrakti obe biljne vrste su korišteni u određivanju antioksidativne aktivnosti, ukupne sposobnosti redukcije ekstrakata FRAP metodom. Ekstrakti ukupnih fenola i flavonoida lista i korijena obe biljne vrste dobijeni su iz liofilizovanog biljnog materijala, koji je homogenizovan u 30% (V/V) etanolu u odnosu 1:10, na sobnoj temperaturi uz miješanje tokom 48 h. Ekstrakti su zatim procijenjeni na vakuumu, uz ispiranje ostatka na filteru ekstragensom, te zbog moguće degradacije termolabilnih komponenti upareni pod sniženim pritiskom na 40°C (Rotavapor R-215, Buchi, Switzerland). Nakon 48 h sušenja u eksikatoru izmjerena je masa ostatka i izračunat prinos. Svi ostatak je rastvoren u etanolu i razblažen do koncentracije od oko 50 mg/mL . Rastvori su čuvani na 4°C do analize. *In vitro* testovi mjerjenja antioksidativne aktivnosti određeni su pomoću Photolab 6600 UV-VIS spektrofotometra.

Za razdvajanje SOD izoformi korištena je nativna elektroforeza sa 10% gelom za razdvajanje. Aktivnost SOD izoformi je određena denzitometrijski pomoću programa Image Master Total Lab TL120 (Nonlinear Dynamics Ltd., Durham, USA). Svi dobijeni rezultati obradeni pomoću softverskog paketa SPSS 24.0 statistical package (IBM, Somers, NY, USA), Origin 8.5 i predstavljeni tabelarno, grafički i kao slike gelova sa razdvojenim izoformama peroksidaza i superoksid dismutaza.

2) Primjenjene metode istraživanja su adekvatne, dovoljno precizne i tačne i savremene ako se uzmu u obzir dostignuća u ovom polju istraživanja na globalnom nivou. Poštovan je plan istraživanja, koji je dat prilikom prijave doktorske teze. Ispitivani parametri daju dovoljno elemenata za pouzdano istraživanje, a statistička obrada podataka je adekvatna.

- 1) Objasniti materijal koji je obradivan, kriterijume koji su uzeti u obzir za izbor materijala;
- 2) Dati kratak uvid u primjenjeni metod istraživanja pri čemu je važno ocijeniti sljedeće:
 1. Da li su primjenjene metode istraživanja adekvatne, dovoljno tačne i savremene, imajući u vidu dostignuća na tom polju u svjetskim nivoima;
 2. Da li je došlo do promjene u odnosu na plan istraživanja koji je dat prilikom prijave doktorske teze, ako jest zašto;
 3. Da li ispitivani parametri daju dovoljno elemenata ili je trebalo ispitivati još neke, za pouzdano istraživanje;
 4. Da li je statistička obrada podataka adekvatna.

VI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

Sadržaj melatonina u listu i korijenu matičnjaka i valerijane u okviru ovog rada razmatran je sa tri aspekta. S jedne strane, praćen je uticaj tretmana biljaka kadmijumom i cinkom (koncentracije 0.015 i 3 g/L) na sadržaj melatonina u organizma valerijane i matičnjaka i njegova distribucija u listu

i korijenu, kako bi se utvrdila varijabilnost u sadržaju melatonina i razlika u biološkom odgovoru na abiotički stres izazvan djelovanjem Cd i Zn. S druge strane, proučavan je uticaj jona Zn i Cd u koncentracijama koje odgovaraju njihovim maksimalnim dozvoljenim u zemljištu za dati metal, na sadržaj melatonina. Konačno, određen je i eventualni uticaj povećanja sadržaja melatonina sa i bez prisustva teških metala na sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, sposobnost neutralisanja slobodnih radikala, antioksidativnu aktivnost ekstrakta biljaka, sadržaj solubilnih proteina, aktivnost nekih antioksidativnih enzima, te heliranja metala.

Identifikacija i kvantifikacija melatonina po prvi put je izvršena u biljkama *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L. primjenom tečne hromatografije visokih performansi povezane sa fluorescentnim i UV-Vis detektorom. Obe biljne vrste nisu pokazale povećanje sadržaja endogenog melatonina u biljkama tretiranih egzogenim melatoninom. Matičnjak je imao pozitivan trend rasta sadržaja endogenog melatonina i to za 40% povećanja u korijenu, te 25% povećanja u listu u odnosu na kontrolu. Egzogeno dodat melatonin dovodi do smanjenja koncentracije endogenog melatonina u korijenu (za 40%) i listu (za 5%).

Dobijeni rezultati su pokazali da su veće koncentracije Zn usvojene od strane lista. Koncentracija Zn u korijenu se povećava prema redoslijedu: kontrola < tretman sa Cd < tretman sa Zn, za obe biljne vrste. Najznačajnije povećanje koncentracije Zn u odnosu na kontrolu je izmjereno u korijenu matičnjaka i valerijane pretretiranih egzogenim melatoninom i tretiranih sa Zn. Akumulacija kadmijuma u listu i korijenu pokazuje značajnu zavisnost od biljne vrste, gdje se kod valerijane uočava znatno veća sposobnost akumulacije Cd i u korijenu i listu u poređenju sa matičnjakom.

Osim identifikacije i kvantifikacije melatonina, te distribucije metala u analiziranim biljnim organima rezultati su pokazali prisustvo značajno veće koncentracije Mg i Ca u listu obe ljekovite vrste u odnosu na korijen.

Rezultati pokazuju statistički značajno povećanje sadržaja magnezijuma u korijenu matičnjaka tretiranog sa Cd (0,15 mg/g) i blago povećanje kod korijena biljaka tretiranih sa Zn (0,11 mg/g) u odnosu na sadržaj u kontroli (0,10 mg/g). Egzogena primjena melatonina dovela je do povećanja sadržaja ukupnih fenola u odnosu na kontrolu kod matičnjaka (2 puta veći sadržaj, 68,9 mg/g). Melatoninom pretretirane biljke tretirane sa Cd i Zn pokazuju statistički značajno veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na kontrolne biljke, međutim njihov sadržaj je značajno manji u odnosu na biljke tretirane teškim metalima bez pretretmana sa melatoninom. Ispitivanje uticaja teških metala i egzogenog melatonina na sadržaj solubilnih proteinu pokazalo je da svi tretmani i pretretman melatoninom utiču na značajno povećanje sadržaja proteinu u korijenu i listu matičnjaka i valerijane. Dobiveni rezultati su pokazali da se aktivnost peroksidaza nakon tretmana sa Cd smanjuje u korijenu i listu obje ispitivane biljne vrste. U listovima matičnjaka su nativnom elektroforezom detektovane tri SOD izoforme, označene kao mSOD1 ($R_f=0,117$), mSOD2 ($R_f=0,834$) i mSOD3 ($R_f=0,886$). U listovima valerijane razdvojene su dvije SOD izoforme, označene kao vSOD1 ($R_f=0,640$) i vSOD2 ($R_f=0,856$). Izoforma vSOD2 detektovana je u svim fazama razvoja kontrolnih i svih tretiranih listova valerijane. Sa druge strane, vSOD1 izoforma detektovana je u svim fazama razvoja samo u kontrolnim listovima valerijane, a njena indukcija i inhibicija zavisi od tretmana i faze razvoja biljke. Antioksidativni testovi pokazali su da egzogeni melatonin utiče na statistički značajno povećanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala i na sposobnost redukcije Fe jona /FRAP test/ ekstrakta korijena i lista matičnjaka i valerijane. List matičnjaka pokazuje značajno veću sposobnost redukcije Cu i Fe jona, te neutralizacije DPPH radikala u odnosu na njegov korijen.

Maksimalna sposobnost biljnih ekstrakata da heliraju željezo uočava se u korijenu i listu biljaka tretiranih teškim metalima, u kombinaciji sa egzogenim melatoninom, što ukazuje na moguće djelovanje egzogenog melatonina u zaštiti od oksidativnog stresa.

Dobijeni rezultati su jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni i poređeni sa rezultatima drugih autora.

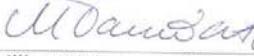
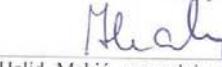
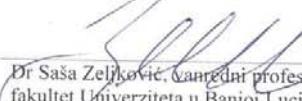
- 1) Ukratko navesti rezultate do kojih je kandidat došao;
- 2) Ocijeniti da li su dobijeni rezultati jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, upoređujući sa rezultatima drugih autora i da li je kandidat pri tome ispoljavao dovoljno kritičnosti;
- 3) Posebno je važno istaći do kojih novih saznanja se došlo u istraživanju, koji je njihov teorijski i praktični doprinos, kao i koji novi istraživački zadaci se na osnovu njih mogu utvrditi ili nazirati.

VII ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

- 1) Doktorska disertacija mr Elvise Hodžić pod nazivom „Kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis L.* i *Valeriana officinalis L.*“ uradena je prema pravilima naučnoistraživačkog rada i rezultat je originalnog naučnog rada kandidata. Pored toga, kandidatkinja je precizno i logički analizirala predloženu temu istraživanja i podatke doveo u vezu sa postavljenom hipotezom. Dobijeni rezultati jasno su ukazali da melatonin, kao vrlo aktivna molekula ima ogroman potencijal za istraživanje osnovnih životnih funkcija i nudi mogućnosti za poboljšanje raznolikosti procesa u kultivaciji biljaka i industrijskoj poljoprivredu.
- Naučna vrijednost ove doktorske disertacije ogleda se i u naučnom radu proizašlom iz dijela aktivnosti na njenoj izradi, a publikovanom u naučnom časopisu koji je indeksiran u renomiranim citatnim bazama (SCI/SCIE) za navedenu naučnu oblast, sa impakt faktorom.
- 2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije Komisija predlaže Nastavno-naučnom vijeću da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom “Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis L.* i *Valeriana officinalis L.*”, prihvati, i da kandidatkinji mr Elvsi Hodžić odobri odbranu.
- 1) Navesti najznačajnije činjenice što tezi daje naučnu vrijednost, ako iste postoje dati pozitivnu vrijednost samoj tezi;
- 2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije komisija predlaže:
- da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana,
 - da se doktorska disertacija vraća kandidatu na doradu (da se dopuni ili izmjeni) ili
 - da se doktorska disertacija odbija.

Datum: april 2019. godine

POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

1. 
Dr Bojana Kukavica, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci,
predsjednik
2. 
Dr Semira Galijašević, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu i vanredni profesor, Sarajevo School of Science and Technology, Medical School, mentor-član
3. 
Dr Milica Balaban, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, mentor-član
4. 
Dr Halid Makić, vanredni profesor, Biotehnički fakultet Univerziteta u Bihaću-član
5. 
Dr Saša Željković, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci-član

IZDVOJENO MIŠLJENJE: Član komisije koji ne želi da potpiše izvještaj jer se ne slaže sa mišljenjem većine članova komisije, dužan je da unese u izvještaj obrazloženje, odnosno razlog zbog kojih ne želi da potpiše izvještaj.