

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**  
**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**1. Одлука Наставно - научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу**

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 27.01.2016. године, одлуком број 01-543/3-11 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Испитивање антимикробне и антиоксидативне активности екстраката три одабране биљне врсте рода *Daphne***“ кандидата дипл. фарм. Мирослава Соврлића, у следећем саставу:

1. **проф. др Ратомир Јелић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, председник;
2. **проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармација, члан;
3. **проф. др Перица Васиљевић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и биотехнологија, члан.
4. **проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан
5. **доц. др Марија Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију дипл. фарм. Мирослава Соврлића и подноси Наставно-научном већу следећи

## ИЗВЕШТАЈ

### 2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата дипл. фарм. Мирослава Соврлића под називом „Испитивање антимикробне и антиоксидативне активности екстраката три одабране биљне врсте рода *Daphne*“, урађена под менторством проф. др Недељка Манојловића, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармацеутска анализа, представља оригиналну студију код нас, која се бави испитивањем хемијског састава, антиоксидативног и антимикробног дејства екстраката добијених од различитих делова три биљне врсте рода *Daphne* са стаништима на територији Републике Србије (*Daphne sneorum* L., *Daphne alpina* L. и *Daphne blagayana* L.).

Ова студија представља оргинално истраживање из области фармакогнозије и фитохемије, базирано на веома интересантној проблематици везаној за употребу неких врста овог рода у традиционалној медицини широм света, активностима које испољавају њихови екстракти и секундарним метаболитима чије је присуство потврђено у екстрактима ових врста.

Биљне врсте рода *Daphne* (*Thymeleaceae*) налазе примену у традиционалним методама лечења, а нарочито су заступљене у Кинеској традиционалној медицини као и традиционалној медицини тропског дела Африке. Користе се у третману различитих болести: гонореје, абсцеса, артритиса, лумбага, различитих облика тумора, као пургативи, антипиретици итд.

Досадашња истраживања су показала да екстракти и изоловани секундарни метаболити из различитих врста овог рода испољавају бројне биолошке активности, као што су антиоксидативна, антимикробна, цитотоксична, антиинфламаторна и имуномодулаторна активност. Испољавање специфичних активности указује на потенцијалан фармаколошки значај *Daphne* врста.

Доступни подаци о хемијском саставу екстраката ових врста указују на присуство једињења и деривата различитих класа секундарних метаболита. Потврђено је присуство различитих фенолних једињења, кумарина и кумаринских деривата, флавоноида и њихових деривата, различитих врста терпенских једињења (сесквитерпени, дитерпени и тритерпени), лигнана и лигнина. Сви ти подаци указују да ове биљне врсте могу представљати извор различитих биоактивних биљних једињења. Чињеница да је до сада око половина *Daphne* врста неистражено указује на посебан значај даљег истраживања, нарочито недовољно истражених врста, како са аспекта утврђивања хемијског састава, тако и биолошких активности.

Специфичност и значај ове докторске дисертације се огледа у укупном сагледавању хемијског састава и утврђивању антимикробног и антиоксидативног дејства екстраката

три *Daphne* врсте са подручја Србије за које су подаци о фитохемији и биолошким дејствима врло оскудни.

Истраживање је засновано на савременим научним сазнањима, методолошки је добро постављено и адекватно спроведено, а проистекли резултати указују да испитиване врсте имају биопотенцијал и да могу представљати извор природних, фармаколошки активних једињења.

## **2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области**

Прегледом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „PubMed“, „Medline“, „KoBSON“, „Science Direct“, „Springer“ помоћу кључних речи „*Daphne blagayana*“, „*Daphne alpina*“, „*Daphne sneorum*“, „HPLC“, „antimicrobial activity“, „antioxidant activity“, не наилази се на студије сличног дизајна и методолошког приступа. Код нас не постоје публиковане студије које су испитивале фитохемијски састав, антиоксидативно и антимикробно дејство екстраката врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana*.

На основу тога Комисија констатује да докторска дисертација кандидата дипл. фарм. Мирослава Соврлића, под називом „Испитивање антимикробне и антиоксидативне активности екстраката три одабране биљне врсте рода *Daphne*“ представља резултат оригиналног научног рада на пољу одређивања хемијског састава, антиоксидативне и антимикробне активности хлороформских и метанолских екстраката врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana*.

## **2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

### **A. Лични подаци**

Мирослав Соврлић, рођен је 10.03.1987. године у Косовској Митровици. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, одсек за фармацију, завршио је 2009. године. На завршној години основних студија је био стипендиста Републичке фондације за младе таленте, Министарства омладине и спорта Републике Србије. Од 2010. год. је запослен на Факултету медицинских наука у Крагујевцу као асистент за ужу научну област Фармацеутска анализа. Анагажован је на пројекту Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије (број 172015) и Јуниор пројекту Факултета медицинских наука (број 2011/05).

Кандидат је аутор или коаутор 6 научноистраживачких радова објављених у целини у домаћим и међународним часописима, од којих су 3 објављена у часописима са импакт фактором на „SCI“ листи.

## Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

1. **Sovrlić M**, Vasiljević P, Jušković M, Mašković P, Manojlović N. Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Profiles of Extracts of *Daphne alpina* (Thymelaeaceae) L Leaf and Twig from Mt Kopaonik (Serbia). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2015; 14(7): 1239-1248. **(M23, 3 поена)**
2. Slobodan M. Jankovic, Dragana Aleksic, Zulfer Bahtijari, Anica Jelic, Jelena Klacar, Aleksandra Kovacević, Natasa Mijailovic, Olivera Milovanovic, Aleksandra Petrovic, Ana Radovanovic, **Miroslav M. Sovrlic**, Dejana Ruzic Zecevic. Risk factors for severe dental anxiety among students of a medical faculty, *Vojnosanitetski Pregled* 2014; 71(1): 16-21. **(M23, 3 поена)**
3. Nedeljko T. Manojlović, Pavle Z. Mašković, Perica J. Vasiljević, Ratomir M. Jelić, Marina Ž. Juskoivić, **Miroslav Sovrlić**, Leka Mandić, Marija Radojković. HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Daphne sneorum* L. *Hemijska industrija* 2012; 66(5): 709–716. **(M23, 3 поена)**

Кандидат Мирослав Соврлић је објавио рад из теме докторске дисертације у часопису са SCI листе као први аутор, на енглеском језику у целини и испунио услов за одбрану дисертације.

### 2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације одговара спроведеним истраживањима. Циљеви истраживања и методологија у раду идентични су са одобреним у пријави тезе.

Докторска дисертација дипл. фарм. Мирослава Соврлића „Испитивање антимикробне и антиоксидативне активности екстракта три одабране биљне врсте рода *Daphne*“ садржи следећа поглавља: Увод, Циљеве рада и хипотезе, Општи део, Материјал и методе рада, Резултате, Дискусију, Закључке и Литературу. Рад садржи 17 табеларних и 12 хистограмских приказа, 43 слике, док је у поглављу „Литература“ адекватно цитирано 195 библиографских референци из савремене домаће и светске литературе.

У уводном и општем делу, кандидат је са теоријског аспекта приказао путеве биосинтезе биљних секундарних метаболита и њихову поделу, са посебним освртом на кумаринске и фенолне метаболите, који су најзасуљенији у испитиваним врстама. Објашњен је механизам антиоксидативног дејства секундарних метаболита као и њихов значај у откривању нових антимикробних агенаса. Позивајући се на валидне литературне податке, приказане су фармаколошке особине и хемијска карактеризација до сада истражених врста рода *Daphne*, њихова употреба у традиционалној медицини, као и бројне студије које су доказале различита фармаколошка дејства ових врста. Јасно и на адекватан начин су описане групе присутних секундарних метаболита у врстама, са детаљним приказом структура појединачних једињења.

У следећем делу докторске дисертације, јасно су изложени циљеви и хипотезе истраживања. Циљеви су били испитивање хемијског састава, антиоксидативне и антимикуробне активности хлороформских и метанолских екстраката гранчица и листова врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana*.

Постављене су следеће хипотезе истраживања: метанолски и хлороформски екстракти гранчица и листова врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana* имају различит садржај фенола и флавоноида; испитивани екстракти различитих делова исте врсте и делова различитих *Daphne* врста садрже различите најзаступљеније секундарне метаболите; испитивани метанолски и хлороформски екстракти гранчица и листова врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana* испољавају специфичне антимикуробне активности; испитивани метанолски и хлороформски екстракти гранчица и листова врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana* испољавају специфичне антиоксидативне активности; метанолски и хлороформски екстракти испитиваних *Daphne* врста могу наћи своју потенцијалну примену као антиоксидативни и антимикуробни агенси.

Материјал и методологија подударни су са наведеним у пријави докторске дисертације и презентовани су на одговарајући начин. Биљни материјал коришћен за екстракцију прикупљен је са подручја планине Копаоник и Суве Планине. Поступак добијања сувих екстраката коришћених за испитивање детаљно је описан. Хемијска анализа екстраката обухватала је одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја и HPLC-UV анализу екстраката. За све примењене методе јасно и прецизно је објашњен поступак извођења експеримента. Идентификација појединих конституената екстраката HPLC-UV методом извршена је компарацијом ретенционих времена и UV спектра конституената са стандардима.

Антиоксидативни потенцијал метанолских и хлороформских екстраката гранчица и листова биљака *D. blagayana*, *D. sneorum* и *D. alpina* процењен је преко више *in vitro* модела. Свака метода је објашњена са теоријског аспекта, а поступак извођења експеримента је јасно и детаљно описан.

За испитивање *in vitro* антимикуробне активности екстраката, коришћене су каталошке културе индикаторских патогених сојева микроорганизама (АТСС - *American Type Culture Collection*) које се најчешће користе за испитивање ефикасности антимикуробних супстанци. За испитивање антибактеријске активности коришћено је шест бактеријских сојева (*Staphylococcus aureus* АТСС 25923, *Klebsiella pneumoniae* АТСС 13883, *Escherichia coli* АТСС 25922, *Proteus vulgaris* АТСС 13315, *Proteus mirabilis* АТСС 14153, *Bacillus subtilis* АТСС 6633), а за испитивање антигљивичног дејства екстраката два гљивична соја (*Candida albicans* АТСС 10231 и *Aspergillus niger* АТСС 16404). Антимикуробне активности испитиване су микродилуционом методом при чему су одређиване минималне инхибиторне концентрације (МИС) екстраката. Поступак култивације микроорганизама и извођење микродилуционе методе су адекватно објашњени. Као референтне супстанце коришћени су тетрациклин и кетоконазол.

За статистичку обраду података коришћен је SPSS софтвер верзија 20.0, а ниво статистичке значајности је био постављен на  $p \leq 0,05$ . Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) је утврђивано постојање статистичке значајности средњих вредности мерења, а накнадним *Tukey HSD* тестом је утврђивано између којих конкретно група постоји статистички значајна разлика.

Резултати истраживања су систематично приказани табелама и графиконима. Коментари резултата су језгровити, а начин приказивања чини их прегледним и разумљивим.

Хемијском анализом испитиваних узорка установљено је да екстракти све три биљне врсте садрже висок садржај фенолних и флавоноидних једињења са одређеним варијацијама. Садржај укупних фенолних једињења је у великој мери зависио од растварача коришћеног за екстракцију. HPLC-UV анализом екстраката идентификовани су најзаступљенији секундарни метаболити екстраката, који припадају кумаринским дериватима и фенолним киселинама. Компарацијом ретенционих времена и UV спектра стандарда са ретенционим временима и UV спектрима једињења присутним у екстрактима идентификована су три једињења: 7,8-дихидроксикумарин (дафнетин), 7-хидроксикумарин (умбелиферон) и 4-хидроксибензоева киселина.

Резултати испитивања *in vitro* антиоксидативне активности показују да екстракти испитиваних врста поседују значајан антиоксидативни потенцијал. Антиоксидативну активност екстракти су испољили у свим моделима који су коришћени за испитивање антиоксидативног потенцијала: укупни антиоксидативни капацитет, DPPH „скевинџер” активност, способност неутралисања OH<sup>•</sup> радикала, инхибиција пероксидације липида и Fe<sup>2+</sup> хелатациону активност.

Применом микродилуционе методе, сви испитани екстракти, су показали антимикуробну активност према тестираним микроорганизмама. Испитивани екстракти су показали и антибактеријску и антифунгалну активност у различитим концентрацијама. Вредности минималних инхибиторних концентрација се кретала у опсегу од 15,62 µg/mL до 125 µg/mL.

У поглављу Дискусија детаљно су објашњени резултати истраживања. Описана су потенцијална тумачења добијених резултата са аспекта до сада познатих чињеница везаних за поједине секундарне метаболите и активности које исти испољавају. Коментари добијених резултата су јасни, а начин приказивања чини их прегледним и разумљивим.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата асист. дипл. фарм. Мирослав Соврлића под називом „**Испитивање антимикуробне и антиоксидативне активности екстраката три одабране биљне врсте рода *Daphne***“, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

## 2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Испитивањем садржаја укупних фенола утврђено је да сви испитивани екстракти имају висок садржај ових једињења. Садржај укупних фенола зависи од поларности растварача коришћеног за екстракцију, дела биљке из које је добијен екстракт (лист или гранчица) као и испитиване *Daphne* врсте. Ове вредности су износиле од  $68,77 \pm 0,95$  mg EGA/g до  $90,26 \pm 0,69$  mg EGA/g. Највећи садржај укупних фенола имају хлороформски екстракт гранчица *D. blagayana* ( $90,26 \pm 0,69$  mg EGA/g) и метанолски екстракт гранчица *D. alpina* ( $88,98 \pm 1,05$  mg EGA/g). Наведени екстракти се међусобно статистички значајно не разликују по садржају укупних фенола ( $p > 0,05$ ).
2. Испитивани екстракти садрже значајне количине флавоноида, чије се вредности крећу од  $24,67 \pm 0,35$  mg ERU/g до  $35,24 \pm 0,55$  mg ERU/g . Највећи садржај укупних флавоноида имају хлороформски екстракти гранчица *D. blagayana* ( $35,24 \pm 0,55$  mg ERU/g) и *D. alpina* ( $34,65 \pm 0,89$  mg ERU/g), као и хлороформски екстракт листова *D. sneorum* ( $34,23 \pm 0,89$ ). Ова три екстракта се међусобно статистички значајно не разликују ( $p > 0,05$ ).
3. Укупан антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката износио је од  $68,98$  mg AA/g до  $78,45$  mg AA/g. Највећи антиоксидативни капацитет имао је хлороформски екстракт гранчица *D. blagayana* који се статистички значајно разликовао од осталих испитиваних екстраката ( $p > 0,05$ ). Испољена активност је пропорционална високом садржају укупних фенола и флавоноида, који је утврђен код наведеног екстракта.
4. Испитивани екстракти су показали способност неутрализације  $\text{OH}^\cdot$  радикала са  $\text{IC}_{50}$  вредностима од  $80,56$   $\mu\text{g/g}$  до  $99,11$   $\mu\text{g/g}$ . Генерално, екстракти листова све три врсте су показали бољу активност од екстраката гранчица. Најбољу активност показује хлороформски екстракт листова *D. alpina* ( $\text{IC}_{50} = 80,56$   $\mu\text{g/g}$ ).
5. Испитивани екстракти испољавају активност у неутрализацији  $\text{DPPH}^\cdot$  радикала са  $\text{IC}_{50}$  вредностима изнад  $20$   $\mu\text{g/g}$ . Најмања  $\text{IC}_{50}$  вредност одређена је за метанолски екстракт листова *D. blagayana* ( $20,95$   $\mu\text{g/g}$ ).
6. Потенцијал инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката креће се у опсегу  $\text{IC}_{50}$  вредности од  $26,79$   $\mu\text{g/g}$  до  $37,17$   $\mu\text{g/g}$ .  $\text{IC}_{50}$  вредности мање од  $30$   $\mu\text{g/g}$  показују екстракти листова *D. alpina* и метанолски екстракти гранчица и листова *D. sneorum*.

7. Испитивани екстракти су испољили  $\text{Fe}^{2+}$  хелатациону активност са  $\text{IC}_{50}$  вредностима од 21,57  $\mu\text{g/g}$  до 45,91  $\mu\text{g/g}$ . Најбоље активности испољавају метанолски екстракти гранчица и листова *D. sneorum* са  $\text{IC}_{50}$  вредностима 21,57  $\mu\text{g/g}$ , односно 23, 15  $\mu\text{g/g}$ . Ова два екстракта се међусобно статистички не разликују по испољеним активностима ( $p > 0,05$ ). Са друге стране, ова два екстракта се од осталих екстраката статистички значајно разликују по испољеној  $\text{Fe}^{2+}$  хелатационој активности ( $p < 0,05$ ).
8. HPLC-UV анализом испитиваних екстраката, потврђено је да екстракти садрже секундарне метаболите из група фенола и кумарина, међу којима доминирају два кумаринска деривата (дафнетин и умбелиферон) и једна фенолна киселина (4-хидроксибензоева киселина).
9. Дафнетин и 4- хидроксибензоева киселина су присутни у испитиваним екстрактима све три *Daphne* врсте, док је умбелиферон присутан само у екстрактима врсте *D. alpina*.
10. Антимикробна активност испитиваних екстраката, изражена преко минималне инхибиторне концентрације кретала се у опсегу од 15,62 до 125  $\mu\text{g/ml}$ . Најбољу антифунгалну активност ( $\text{MIC}=15,62 \mu\text{g/ml}$ ) испољавају хлороформски екстракт листова и метанолски екстракт гранчица врсте *D. sneorum* (према *C. albicans*) и метанолски екстракт гранчица врсте *D. blagayana* (према *A. niger*).

## 2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати испитивања ове докторске дисертације јасно указују на значајну *in vitro* антиоксидативну и антимикробну активност екстраката добијених од листова и гранчица врста *D. alpina*, *D. sneorum* и *D. blagayana* са подручја Србије. Испољене активности су специфичне за сваку врсту и зависе од хемијског састава екстракта, који је специфичан за део биљке који је испитиван и примењени растварач. Висок садржај укупних фенола и флавоноида, као и присуство појединачних метаболите, чини ове врсте погодним извором за изоловање природних, фармаколошки активних једињења, са потенцијалном применом у фармацеутској, козметичкој и прехранбеној индустрији. Испољене биолошке активности у *in vitro* условима дају оправданост даљег испитивања активности екстраката ових врста у моделима *in vivo*.

## 2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати испитивања екстраката врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana*. су публиковани у 3 часописа од међународног значаја (M23), као и у 2 часописа националног значаја (M52), а планирано је да остали резултати овог истраживања буду публиковани као оригинално истраживање у часопису од међународног значаја, односно презентовани на научним и стручним скуповима у форми усмене или постер презентације.



## ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену завршене докторске дисертације кандидата асист. дипл. фарм. Мирослава Соврлића под „Испитивање антимикуробне и антиоксидативне активности екстраката три одабране биљне врсте рода *Daphne*“, оцењује да је истраживање у оквиру дисертације утемељено на актуелним сазнањима и валидној методологији и да је прецизно и адекватно спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата асист. дипл. фарм. Мирослава Соврлића, урађена под менторством проф. др Недељка Манојловића, представља оригинални научни допринос у потпунијем сагледавању хемијског састава, антиоксидативне и антимикуробне активности екстраката врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana* и да обухваћене врсте могу представљати извор нових, природних, фармаколошки активних једињења са потенцијалном применом у фармацеутској, козметичкој и прехранбеној индустрији.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом **„Испитивање антимикуробне и антиоксидативне активности екстраката три одабране биљне врсте рода *Daphne*“** кандидата дипл. фарм. Мирослава Соврлића буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

## **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

---

**проф. др Ратомир Јелић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, председник;

---

**проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија и токсикологија и  
Клиничка фармација, члан;

---

**проф. др Перица Васиљевић**, ванредни професор Природно-математичког факултета  
Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и биотехнологија,  
члан;

---

**проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета  
у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.

---

**доц. др Марија Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у  
Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

У Крагујевцу,

28.01.2016. год.