

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КРАГУЈЕВАЦ**

**ИЗБОРНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ**

**Предмет: Оцена научне заснованости теме докторске дисертације**

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-1652/3-3 од 9.3.2010. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата мр пх **ДРАГИЦЕ БОЈОВИЋ**, под називом:

**„Упоредно испитивање екстраката (водено-етанолног и воденог) неких *Satureja* врста са различитих локалитета из Црне Горе”**

На основу одлуке Изборног већа, формирана је трочлана комисија у саставу:

- 1. проф. др Слободан Јанковић**, председник и потенцијални ментор, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација;
- 2. проф. др Драган Миловановић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија;
- 3. др Вања Тадић**, члан, научни саветник Института за проучавање лековитог биља „др Јосиф Панчић“ у Београду, за ужу научну област Фармација и хемија природних производа.

На основу увида у приложену документацију Комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи

# ИЗВЕШТАЈ

## I. ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

### A. Биографија кандидата

Кандидат мр пх Драгица Бојовић, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

#### *Лични подаци*

Драгица Бојовић је рођена 15.10.1958. у Врбасу, Србија. Основну школу и гимназију завршила је у Никшићу, а Фармацеутски факултет у Сарајеву 1997-1982. Године. Специјализацију из фармакогнозије на Фармацеутском факултету у Београду завршила је 1992. године, одбранивши специјалистички рад са темом „Алкалоиди коре нара са подручја Црне Горе“. Уписала је Докторске академске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу 2007 године, и положила усмени докторски испит 9.7.2009.

Драгица Бојовић је приправнички стаж обавила у апотеци Никшић, у којој је затим радила још 5 година. У периоду од 1992-1997 радила је као специјалиста за љековито биље. Са колегиницама из фармацеутске технологије и контроле лекова организовала је прву производњу у Галенској лабораторији Апотекарске установе Црне Горе, за потребе 40 апотека. Од 1997 године, одлуком Владе Црне Горе Галенска лабораторија прелази у састав новоосноване фармацеутске куће ICN Црна Гора. Од 2006 године, ICN Црна Гора мења име у Галеника Црна Гора, где Драгица Бојовић данас ради као руководилац Сектора контроле квалитета. Од септембра 2009 године ангажована је као Стручни сарадник на Студијском програму фармације Универзитета у Подгорици, на предмету фармакогнозија.

### B. Публиковани радови

*1. Монографска студија/поглавље у књизи, или рад у тематском зборнику међународног значаја*

1. Вања М.Тодић, Силва Добрић, Горан М.Марковић, Драгица Бојовић, *The analysis of pharmacologically active compounds and biomolecules in real samples*, Transworld Research Network, 2009.  
(ИСБН 978-81-7895-41-2) (монографија није категорисана)

## 2. Радови објављени у часописима националног значаја (М53)

1. Зорица Р.Потпара, Снежана М.Цупара, Нада Ђ. Марстијековић, Драгица Р. Бојовић. *Медицински пелоид*, Рационална терапија, 2009, Vol.I, No 2, стр.25-30/УДК 615.838.7 (часопис није категорисан)
2. Драгица Р. Бојовић, Снежана М. Цупара, Вања М. Тодић, Зорица Р. Потпара, *Јестиве аутохтоне биљке у Црној Гори*. Рационална терапија, 2010, Vol.II, No 1, стр.17-25/УДК 581.6:641(497.16) (часопис није категорисан)

## 3. Саопштења са националног скупа, штампана у изводу (М 64)

1. Дејан Јанчић, Милена Ђуришић, Драгица Бојовић, *Динамика промета и начин продаје дијететских суплемената на територији града Подгорице*, Други Конгрес о дијететским суплементима са међународним учешћем, Београд 10-12 децембар 2009., Зборник апстраката, стр.130,131. (М64; 0,2 бодова)

**Укупно = 0.2 бода**

## II. ПОДАЦИ О ПРЕДЛОЖЕНОЈ ТЕМИ

### ПРЕДМЕТ РАДА

Последњих деценија, у складу са светским трендом повратка природи у фармацији и медицини, велика пажња посвећује се проучавању лековитог биља и њиховој примени у фармакотерапији. Сходно овом савременом приступу у примени лековитог биља, предмет овог истраживања јесте хемијска карактеризација водено-етанолног и воденог екстракта самониклих биљних врста *Satureja montana* L. subsp. *montana*, *S. subspicata* Vis., *S. kitaibelii* Wierzb.

ex Heuff., *S. horvatii* Šilić, *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, Lamiaceae са различитих локалитета у Црној Гори, *in vitro* испитивања антиоксидативне и микробиолошке активности наведених екстраката, и *in vivo* испитивања антиинфламаторне, гастропротективне и спазмолитичне активности. На основу хемијске карактеризације и валидације биолошке активности водено-етанолног и воденог екстракта надземног дела *S. montana* subsp. *montana*, хемијске карактеризације и испитивања биолошке активности водено-етанолног и воденог екстракта надземних делова осталих наведених врста (*S. subspicata* Vis., *S. kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., *S. horvatii* Šilić, као и *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch биће упоређене биолошке активности екстраката надземних делова наведених врста. Овакав приступ омогућиће формулацију препарата са екстрактом вреска намењеног ублажавању тегоба код обољења респираторног тракта поштујући принципе актуелних праваца у истраживањима биљних сировина у савременој фармацији.

## ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви овог истраживања су:

1. Урадити карактеризацију хемијског састава етанолно-водених и водених екстраката самониклих биљних врста *Satureja montana* L. subsp. *montana*, *S. subspicata* Vis., *S. kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., *S. horvatii* Šilić, *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, Lamiaceae са различитих локалитета у Црној Гори
2. Спровести *in vitro* експерименте за утврђивање антиоксидативне и антимикробне активности испитиваних екстраката
3. Спровести *in vivo* експерименте за утврђивање антиинфламаторног и гастропротективног дјеловања испитиваних екстраката
4. Испитати спазмолитичко дејство на изолованом мишићу глатке мускулатуре

## ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

1. Резултати испитивања састава екстраката ће указати да су фенолна једињења, поред етарског уља, главни конституенси испитиваних екстраката
2. Резултати *in vitro* и *in vivo* тестова са издвојеним екстрактима потврдиће претпостављено биолошко деловање
3. Постоји веза између квалитативног и квантитативног састава испитиваних екстраката и испољене биолошке активности.

4. Резултати *in vitro* и *in vivo* тестова ће потврдити оправданост коришћења испитиваних врста у традиционалној медицини
5. Постоји оправданост одабира наведених биљних врста из флоре Црне Горе за фармаколошко и фармакогнозијско испитивање

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### *Порекло биљне сировине*

За потребе остваривања задатих циљева ове докторске дисертације, биљни материјал, надземни делови пет самониклих биљних врста *Satureja montana* L. subsp. *montana*, *S. subspicata* Vis., *S. kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., *S. horvatii* Šilić, *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, Lamiaceae ће бити прикупљени у вријеме цветања са различитих локалитета у Црној Гори.

Узорци ће бити сушени на природан начин, прострти у танком слоју, на промајном мјесту, заштићени од свјетлости, уз свакодневно превртање.

### *Припрема етарског уља, водено-етанолних и водених екстраката испитиваних биљних врста*

Етарско уље испитиваних врста се добиће се дестилацијом помоћу водене паре у апарату по Клевенцеру, методом прописаном у Ph. Jug. IV.. Садржај етарског уља се изражава процентуално, у односу на суву масу биљног материјала.

Водено-етанолни екстракт се добија мацерацијом 70% етанолом, на собној температури, до обезбојавања екстракта. Добијени екстракт се упарава до сувог на вакуум упаривачу и одређује се принос екстракције, у процентима у односу на суву масу.

Водени екстракт се добија преливањем 5.00г уситњеног надземног дела биљке са 200 мл прокључале воде. После 30 мин, приступило се цеђењу, а добијени екстракт је упарен до сувог на вакуум упаривачу. Принос екстракције се изражава процентуално, у односу на суву масу.

### *Хемијска карактеризација испитиваних узорака*

Садржај етарског уља одређује се према пропису Ph. Jug IV.

**Квалитативна и квантитативна анализа етарског уља** радиће се на:

**GC и GC/MS** апаратима. Услови анализе би били следећи: аналитички гасни хроматограф GC-A Varian model 3400, split/splitless инјектором (250 °C) и 30 m x 0.32 mm DB-Wax silica капиларном колоном и FID ( 300 °C) коришћен за GC и GC/MS анализу. Мјерења би се радила под условима градијентног температурног мода, од 50 °C, 3 мин, а затим до 200 °C уз пораст температуре 10 °C/мин. Гас носач је био 3 ml H<sub>2</sub>/min. Површина пикова се рачуна електронски од стране Varian DS-604.

**GC/MS** – гасни хроматограф је спојен преко отвореног спли моста и затопљене силицијумове капиларе (250 °C) са јонским извором Finnigan MAT 8230 масеног спектрометра који је опремљен компјутером(PDP 11/74 ). Радни услови: гас

носач 2 ml He/min; остали GC услови као горе већ поменути. MS-извор јона (electron impact), 170 °C, 70 eV. Конституенци ће бити идентификовани коинјектирањем одговарајућих стандарда и поређењем њихових масених спектра са оним из MS библиотеке једињења (Wiley, 1984), узимајући у обзир релативна ретенциона времена.

За одређивање садржаја активних једињења у испитиваним узорцима користиће се званичне методе Ph. Eur. 6, Ph. Jug. IV и HPLC метода. Узорци би се припремали према одговарајућим прописима, који су наведени у методама : садржај танина, флавоноида по DAB X, испитивање етарског уља.

- **Садржај танина** би се одређивао по Ph. Eur. 6.0
- **Садржај флавоноида** би се одређивао по DAB X (Процент флавоноида изражаван као хиперозид представља средњу вриједност ± стандардна девијација три мјерења. Узорци се екстрахују смјесом ацетона и HCl загријавањем на воденом купатилу уз повратни хладњак. Додатком AlCl<sub>3</sub> настаје обојени комплекс; комплекс се екстрахује етил-ацетатом и његова апсорбанција се мјери UV-VIS спектрофотометром HP 8453 на 425 nm.
- **Одређивање укупних фенола** би се радило по модификованој Folin-Ciocalteu методи (Принцип методе: 100μl сувог метанолног екстракта испитиваних биљних врста (62, 124 и 310 μg/ml коначне концентрације) помијешано је са 0.75 ml Folin-Ciocalteu регенса (претходно 10 пута разблаженог дестилованом водом). Та смеша се оставља на t 22 °C да одстоји 5 мин; после тога смеси се додаје 0.75 ml раствора Na-bikarbonata (60 g/L). Након 90 мин на t 22 °C, апсорбанција се мери на UV-VIS спектрофотометру HP 8453 на 725 nm. Резултати представљају садржај еквивалената галне киселине.
- **Одређивање садржаја флавоноида и фенилкарбонских киселина у биљном материјалу пре и после хидролизе**
- **Припрема узорка**
- За одређивање флавоноида и фенилкарбонских киселина HPLC методом, узорци се припремају на следећи начин:

Испитивана дрога се самеље. Одмери се 1,00 г хомогене испулверизоване дроге, пренесе у балон, дода 10 ml метанола и загрева са повратним хладњаком 30 минута. Раствор се профилира преко вате у одмерни суд од 25 ml, вата добро исцеди и врати у балон, а екстракција понови још 2 пута са 10 и 5 ml метанола. Добијени екстракти се споје са првим у одмерном суду од 25 ml. Суд се допуни метанолом до ознаке. Добијени раствор се профилира кроз PTFE(политетра-флуоретилен) мембрански филтер.

- Припрема хидролизованых узорака:

Одмери се тачно око 175,00 mg хомогене испулверизоване дроге, пренесе у балон, дода 10 ml метанола и 2,5 ml концентроване хлороводоничне киселине и загрева са повратним хладњаком 2,5 сати на температури од 85°C. Када се раствор охлади, пренесе се из балона у одмерни суд од 25 ml, дода 10 ml метанола, држи на ултразвучном купатилу 10 минута и суд допуни метанолом до ознаке. Раствор је стабилан 24 сата.

Пре HPLC анализе, раствори се филтрирају кроз 0.2 μm PTFE филтере. Ињектовани волумени за растворе испитиваних узорака, као и за растворе стандардних супстанција били би 4 μL. Идентификација једињења се уради захваљујући поређењу ретенционих времена спектралним карактеристикама. Када су спектралне карактеристике

једињења из испитиваног узорка идентичне са спектралним карактеристикама стандардних супстанци, резултати би били потврђивани упоређивањем са спектрима стандарда провјером чистоће пикова. Пикови који не би испуњавали ове захтеве неће се квантификовати. Квантификација се ради применом калибрационе криве методом екстерног стандарда.

### **HPLC метода**

#### **Хроматографски услови:**

- **Хроматографски систем:** HPLC System 1200 Agilent Technologies са бинарном пумпом, PDA детектором и аутосамплером
- **Колона:** LiChrospher 100 RP-18e (250 x 4,6 mm x 5 µm)
- **Мобилна фаза А:** Отпипетира се 9,8 ml 85% ортофосфорне киселине и раствори у 500 ml воде HPLC чистоће.
- **Мобилна фаза Б:** Acetonitril

#### **Програм рада пумпи:**

0 min	11% B
0-35 min	11-25% B
35-55 min	25-40% B
55-60 min	40-65% B
60-70 min	65-100% B

**Таласна дужина детекција:** 360 nm, 280 nm, 325 nm

**Вријеме трајања анализе:** 70 минута

**Раствори стандарда** (сви раствори се добијају растварањем стандардних супстанци у метанолу):

**Standard rutina: 0.019 mg/ml**  
**Standard hiperozida: 0.022 mg/ml**  
**Standard izokvercitrina: 0.044 mg/ml**  
**Standard quercetin-dihidrata: 0.020 mg/ml**  
**Standard apigenin-7-O-glukoziada: 0.062mg/ml**  
**Standard apigenina: 0.035 mg/ml**  
**Standard viteksina: 0.042 mg/ml**  
**Standard viteksin-2-O-ramnozida: 0.042mg/ml**  
**Standard luteolin-7-O-glukoziada: 0.0045mg/ml**  
**Standard luteolina: 0.0045 mg/ml**  
**Standard kafene kiseline: 0.026 mg/ml**

**Standard hlorogenske kiseline: 0.024 mg/m**  
**Standard protokatehina: 0.012 mg/ml**  
**Standard gentizinske kiseline: 0.0128 mg/ml**  
**Standard vanilične kiseline: 0.0124 mg/ml**  
**Standard siringične kiseline: 0.0144 mg/ml**  
**Standard p-kumarina: 0.0136 mg/ml**  
**Standard ferula kiseline: 0.0124 mg/ml**  
**Standard sinapične kiseline: 0.0112 mg/ml**

### ***In vitro* испитивање антиоксидативне и микробиолошке активности**

**Испитивање антиоксидативног потенцијала** испитиваних узорака спровело би се применом DPPH методе. DPPH ( $\alpha, \alpha$ -Difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil) тест се спроводи у складу са процедуром коју је предложио Blois, са незнатним модификацијама. Различите концентрације узорака (100  $\mu$ L) помешају се са 900  $\mu$ L 0.04 mg/mL метанолног раствора DPPH. UV спектри се снимају на UV-VIS Спектрофотометру HP 8453. Абсорбанција на 517 nm мери се после 20 мин. Процент инхибиције израчунава се применом следеће формуле:

$$I = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

гдје је I проценат инхибиције,  $A_c$  је абсорбанција негативне контроле (садржи 100  $\mu$ L MeOH уместо испитиваног узорка), и  $A_s$  је абсорбанција испитиваног узорка. Синтетски антиоксиданти, чије је антиоксидативно својство валидирано, troloks и *t*-butil hidroksitoluen (BHT), коришћени су као позитивне контроле. Процент инхибиције се приказује у функцији концентрације испитиваних узорака, а  $EC_{50}$ -вредности, одређене применом линеарне регресионе анализе, представљају средњу вредност  $\pm$  стандардна девијација три одређивања. Рачунање  $EC_{50}$  вредности је засновано на садржају укупних фенола у екстракту.

***In vitro* антимикробна активност** испитиваних екстраката тестираће се у односу на контролне сојеве који припадају АТЦ колекцији, Meryland, USA:

#### **Грам негативни сојеви:**

*Escherichia coli* ATCC 25922,  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,  
*Proteus mirabilis* ATCC 14273;

Спровешће се анализа диск-дифузионом методом, мерењем величине зона инхибиције раста бактерија. Стандардни антибиотик, гентамицин (10  $\mu$ g/диск) се користи као контрола сензитивности тестираних бактерија и гљивица. Испитивани узорци се растварају у DMSO. Као слепа контрола употребљава се диск са растварачем. Muller-Hinton Agar се употребљава као подлога за раст бактеријских сојева. Све агар плоче се припремају у 90-mm Петри шољи, са 25 ml агара, дебљина агара је до 4 mm. MIC, минимална инхибиторна концентрација ће се одређивати микродилуционом методом.

### ***In vivo* испитивање антиинфламаторног и гастропротективног деловања**

Одрасле, мушке јединке Wistar пацова, масе 200-300 g, користиће се за валидирање антиинфламаторне (карагенином индукован едем шапице пацова) активности. Експерименталне групе се састоје од 6-10 животиња. Животиње не једу 18-20 сати прије почетка експеримента, а имају слободан приступ води.

#### **Карагенином индукована инфламација шапице пацова.**



Карагенином индукован едем шапице пацова представља експериментални модел за испитивање антиинфламаторне активности, према модификованој методи коју су дали Ouyangui and Sato Испитивани екстракти се апликују р.о.у дозама од 50, 100, 200 mg/kg. Индометацин, растворен у DMSO, представља референтну супстану у дози од 4 mg/kg р.о. условљавајући 50% смањење едема на шапици пацова. Контролним животињама се даје DMSO у дози од 1 mg/kg р.о. Раствор карагенина у физиолошком раствору (0.5% у запремини од 0.1 mL) се апликује на плантарну површину десне шапице пацова један сат након оралне администрације испитиваних екстраката или индометацина. Физиолошки раствор (0.9% NaCl, 0.1 mL) ињектује се у леву шапицу пацова, која представља контролу (шапица која није захваћена инфламацијом). Животиње се жртвују 3 сата послје апликације карагенина, а шапице се одсеку и измере. Разлика у тежини између десне и леве шапице пацова, одн. шапице која је била захваћена инфламацијом и контролне, представља показатељ интезитета инфламаторног одговора (односно антиинфламаторне активности).

### Статистичка анализа.

Проналажење везе између показаних *in vitro* и *in vivo* ефеката и хемијског састава била би основа за статистичку анализу. Корелација између концентрације активних компонената у екстрактима самониклих *Satureja* врста и њиховог антиинфламаторног или неког другог ефекта радили би се према Spearman-овој анализи корелације рангова. Ако се утврди да је сигнификантност  $p < 0.05$ , значи да постоји корелација између параметара. Зависност биолошких одговора од концентрације активних принципа у екстрактима ће се доказивати тестирањем статистичке значајности линеарне регресије и коефицијента корелације.

### *Испитивање спазмолитичног деловања*

Испитивање спазмолитичког деловања радило би се на изолованим сегментима Фалопијеве тубе, методом мерења контрактилности. Тонус ће се пратити помоћу изометријског трансдјусера и регистровати на рачунару који посједује одговарајући софтвер.

**Формулација препарата** Позитивни резултати наведених испитивања би омогућили стандардизацију добијених екстраката који би чинили активну компоненту следећих формулација:

- **капсуле**, per os примјена за децу и одрасле
- **ориблете**, тврдо компримоване таблете за сисање, спорије отпуштање активне компоненте омогућава дуже задржавање на слузници горњих респираторних путева.
- **сируп**, стандардизовани екстракт у sirupus simplex i propylenglycolu, per os примена погодна за млађу децу.

## ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ И ЗНАЧАЈ СТУДИЈЕ

Резултати свих горе наведених испитивања: физичко-хемијских, *in vitro* и *in vivo* испитивања водено-етанолних и водених екстраката биће основа за процену оправданости употребе самониклих *Satureja* врста у традиционалној терапији.

Стандардизовани екстракти послужили би као основа за производњу фармацеутских препарата (**фитопрепарата, фитофармака**) намињених у превентиви и за ублажавање тегоба код обољења респираторног система.

## III. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, мр пх Драгица Бојовић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу, где се испитују биолошки ефекти екстраката самониклих биљака врста *Satureja*.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза мр пх Драгице Бојовић под менторством проф. др Слободана Јанковића бити од великог научног и практичног значаја, да се свеобухватно сагледају биолошки ефекти екстраката самониклих биљака врста *Satureja*.

4. Комисија предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **мр пх Драгице Бојовић, уз корекцију назива**, под новим називом **„Испитивање биолошке активности екстраката самониклих врста *Satureja*”** и одобри њену израду.

### Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже проф. др Слободана Јанковића, редовног професора Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

проф. др Слободан Јанковић, председник комисије и потенцијални ментор, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

---

проф. др Драган Миловановић, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

---

Др Вања Тадић, члан, виши научни сарадник Института за проучавање лековитог биља „др Јосиф Панчић“ у Београду, за ужу научну област Фармација и хемија природних производа

---

У Крагујевцу, 22.3.2010.