

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
КРАГУЈЕВАЦ

ПРИЈЕМАНИ			
08.11.2018			
Организација	Број	Датум	Сведност
01	13/20/1		

**ОДЛУКА ВЕЋА ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ О  
ФОРМИРАЊУ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ  
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На седници већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној дана 06.06.2018. године одлуком бр. IV-03-449/37 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом “Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Phycia semipinnata*” кандидата Јовице Томовић у саставу:

1. **Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник;
2. **Проф. др Перица Васиљевић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и биотехнологија, члан;
3. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију кандидата Томовић Јовице 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 Јовице Томовић под називом “Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*”, урађена под менторством проф. др Недељка Манојловића, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармацеутска анализа, представља оригиналну студију, која се бави испитивањем хемијског састава, антиоксидативног и антитуморског дејства екстраката добијених од три различите врсте лишајева (*Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*) са стаништима на територији Републике Србије.

Испитивање хемијских, биолошких и фармаколошких особина природних производа коришћених у традиционалној медицини широм света добијени су многи терапеутски агенси који се данас користе у савременој медицини. Велики број једињења је изолован из биљних организама, структура им је хемијски детерминисана, а фармаколошко деловање потврђено. Изолована једињења су имала исту, или много јачу активност од екстраката који су коришћени, што је отворило пут у коришћењу чистих једињења за третман различитих болести. Улажу се велика средства у синтезу нових лекова, али и у изоловање молекула из природних ресурса и њихов развој у лекове.

Лишајеви су група организама која су веома бројна и заступљена, а веома мало позната. Лишајеви имају врло важну улогу како у исхрани људи и животиња, тако и у фармацеутској индустрији и традиционалној медицини. Лишајеви су показали широк спектар биолошког потенцијала, али су дуго били занемаривани од стране миколоога и фармацеутске индустрије због њиховог спорог раста и потешкоћа приликом њиховог вештачког гајења. Састојци лишајева су примарни и секундарни метаболити за које је доказано да имају широк спектар биолошке активности. Досадашња истраживања су показала да екстракти и метаболити појединих врста лишајева испољавају различита антимикробна, антиоксидативна и антитуморска својства. Фитохемијским студијама

истражених *Cladonia*, *Pleurosticta* и *Physcia* врста је потврђено присуство активних састојака који по својој структури припадају кумаринима, флавоноидима, бифлавоноидима и депсидима.

Посебан значај овог истраживања лежи у томе да, до сада, постоји веома мало података о хемијском саставу и биолошкој активности лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*. Овим истраживањем се употпуњују сазнања о нашим недовољно истраженим природним ресурсима лишајева. Потврђено је присуство различитих фенолних једињења, депсида и депсидона. Сви ти подаци указују да екстракти ових лишајева имају биопотенцијал и да могу послужити као извор нових, биолошки и фармаколошки активних једињења. Резултати хемијске анализе и испољених биолошких активности указују на повезаност присутних секундарних метаболита са испољеним активностима испитиваних екстраката. Овим истраживањем идентификовани су секундарни метаболити који могу имати ширу примену у медицини, у фармацеутској, прехранбеној и козметичкој индустрији, као и у развоју нових фитопрепарата.

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

Прегледом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем доступних биомедицинских база података „PubMed“, „Medline“, „KoBSON“, „Science Direct“, „Springer“ помоћу следећих кључних речи: „*Cladonia subulata*“, „*Pleurosticta acetabulum*“, „*Physcia semipinnata*“, „HPLC“, „antioxidant activity“, „cytotoxic activity“ нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа.

На основу тога, Комисија констатује да је докторска дисертација кандидата Јовице Томовић под називом: „Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*“ представља резултат оригиналног научног рада.

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

#### А. Кратка биографија кандидата

Јовица Томовић је рођен 20.01.1987. године у Пећи. Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу уписао је 2005/2006. године, а дипломирао 2010. године. Докторске академске студије је уписао школске 2011/12. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу – изборно подручје: Клиничка и експериментална фармакологија, на којима је положио све планом и програмом предвиђене испите. Усмени докторски испит положио је 19.06.2015. године. Завршио је приправнички стаж и положио стручни испит за здравствене раднике ВСС-Министарство здравља Републике Србије. Од 22.05.2014. године је запослен као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска анализа на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. У звање асистента за ужу научну област Фармацеутска анализа биран је 2016. године. Активно се бави научноистраживачким радом везаним за изучавање хемијског састава и биолошких активности различитих биљака и лишцајева. Тема докторске дисертације под насловом “Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишцајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*” прихваћена је 13.04.2016. године на Факултету за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу. Аутор је и коаутор више научних радова објављених у целости у међународним и домаћим часописима. Ожењен је и има двоје деце.

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

1. **Tomović J**, Kosanić M, Ristić S, Ranković B, Stanojković T, Manojlović, N. Chemical composition and bioactive properties of the lichen, *Pleurosticta acetabulum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2017; 16(12): 2977-2984. **M23**
2. Bursać-Mitrović M, Milovanović DR, Mitić R, Jovanović D, Sovrlić M, Vasiljević P, **Tomović J**, Manojlović N. Effects of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol on biochemical parameters of swimming-induced oxidative stress in serum of guinea pigs. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2016; 13(4): 29-33. **M23**

3. Tomović J, Rančić A, Vasiljević P, Mašković P, Živanović S, Manojlović N, Sovrlić M. Antioxidant activity of lichen *Cetraria Aculeata*. *Praxis Medica* 2015; 44(1): 107-113. **M52**
4. Rančić A, Tomović J, Vasiljević P, Aleksić M, Jušković M, Najman S, Manojlović N. Effects of the Toluene and Methanol Extract of *Senna (Cassia angustifolia Vahl)* on viability and proliferation HeLa cells. *Praxis Medica* 2015; 44(4): 1-4. **M52**

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

Наслов докторске дисертације одговара спроведеном истраживању. Такође, циљеви и хипотезе истраживања су остали непромењени, односно идентични су са одобреним у пријави тезе. Докторска дисертација Јовице Томовића садржи следећа поглавља: увод, циљ рада и хипотезе, материјал и методе, резултати, дискусија, закључак и литература. Написана је на 150 страна и има 27 табела, 25 графикона и 30 слика.

У уводном делу кандидат је цитирајући релевантну литературу, приказао морфологију, анатомију, еколошке карактеристике и значај лишајева као и употребу у традиционалној медицини. Посебна пажња у уводном делу је посвећена биосинтези секундарних метаболита лишајева и њиховој подели, са детаљним приказом структура појединачних једињења. Позивајући се на валидне литературне податке, приказане су биолошке активности (са посебним освртом на антиоксидативну и антитуморску активност) и хемијска карактеризација до сада истражених врста лишајева. Објашњен је и механизам антиоксидативног и антитуморског дејства секундарних метаболита лишајева.

У следећем делу докторске дисертације изложени су циљеви рада и хипотезе који су идентични са одобреним приликом пријаве тезе. Општи циљ овог истраживања је испитивање хемијског састава, антиоксидативне и антитуморске активности ацетонских и метанолских екстраката врста лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* и утврђивање постојања специфичности и разлика у хемијском саставу и активностима екстраката ове три врсте.

У поглављу материјал и методе кандидат је детаљно и јасно описао методологију спроведеног истраживања. Лишајеви коришћени за екстракцију су сакупљени на подручју планине Копаоник. 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 одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја у испитиваним екстрактима коришћена је *UV/VIS* спектрофотометрија. Високофикасна течна хроматографска анализа (*HPLC*) са *UV* детекцијом примењена је за раздвајање и идентификацију појединих конституената екстраката. Идентификација појединих конституената екстраката је извршена компарацијом ретенционих времена и *UV* спектра конституената са стандардима. Антиоксидативни потенцијал ацетонских и метанолских екстраката врста лишајева: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* процењен је преко више *in vitro* модела како би се надоместила комплексност дејства антиоксиданата. Антитуморски потенцијал ацетонских и метанолских екстраката врста лишајева: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* процењен је коришћењем МТТ теста. За све примењене методе јасно и прецизно је објашњен поступак извођења експеримента. Статистички софтвер SPSS (верзија 20) коришћен је за анализу добијених података, а ниво статистичке значајности је био постављен на  $p \leq 0,05$ . Једнофакторска анализа варијансе (АНОВА) коришћена је за утврђивање постојања статистичке значајности средњих вредности мерења. Накнадним *Tukey HSD* тестом је утврђивано између којих конкретно група постоји статистички значајна разлика.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани табелама (укупно 23) графиконима (укупно 25) и сликама (укупно 16). Хемијском анализом испитиваних узорака установљено је да екстракти све три врсте лишајева садрже висок садржај фенолних и флавоноидних једињења са одређеним варијацијама. Садржај укупних фенолних и флавоноидних једињења је зависио од растварача коришћеног за екстракцију. *HPLC-UV* анализом екстраката идентификовани су најзаступљенији секундарни метаболити који припадају класама једињења: депсиди и депсидони. Компарацијом ретенционих времена и *UV* спектра стандарда са ретенционим временима и *UV* спектрима једињења присутним у екстрактима идентификована су следећа једињења: хипопротоцетраринска киселина, фумаропротоцетраринска киселина, салазинска киселина, норстихнинска киселина, протоцетраринска киселина, евернијска киселина, атранорин, леканорна киселина и обтусинска 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, способност неутралисања DPPH· радикала, способност неутралисања OH· радикала, редукциони капацитет и инхибиција липидне пероксидације. Применом МТТ теста, испитивани екстракти испољили су антитуморску активност према коришћеним ћелијским линијама. Испитивани екстракти показали су антитуморску активност у различитим концентracијама при чему се вредност IC<sub>50</sub> кретала од 13,55 до >200 µg/ml, у зависности од екстракта и испитиване ћелијске линије.

У поглављу дискусија детаљно су објашњени резултати истраживања, у светлу досадашњих истраживања, редоследом којим су изложени у претходном поглављу. Описана су потенцијална објашњења добијених резултата, са аспекта до сада познатих чињеница, у вези са секундарним метаболитима лишајева и испитиваном активношћу. Коментари добијених резултата су јасни, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим.

У поглављу литература кандидат је прецизно навео сву литературу коришћену у припреми и реализацији овог истраживања. Литература садржи 192 библиографске јединице из домаћих и иностраних стручних публикација.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата Јовице Томовића под називом “Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*”, по обиму и квалитету израде одговара пријављеној теми дисертације.

## 2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајни резултати спроведеног истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. *HPLC-UV* анализом испитиваних екстраката лишајева, утврђено је присуство секундарних метаболита из група депсидона (хипопротоцетраринска киселина, фумаропротоцетраринска киселина, салазинска киселина, норстихнинска киселина и

протоцетраринска киселина) и депсида (евернијска киселина, атранорин, леканорна киселина и обтусинска киселина).

- У погледу садржаја укупних фенола испитивани екстракти су имали значајне количине истих. Највећи садржај укупних фенола имали су метанолски екстракт лишаја *P. acetabulum* ( $73,45 \pm 0,82$  mg EGA/g) и метанолски екстракт *P. semipinnata* ( $59,20 \pm 2,13$  mg EGA/g).
- Испитивани екстракти лишаја садрже и значајне количине флавоноида, при чему највећи садржај укупних флавоноида су имали метанолски екстракт *P. semipinnata* ( $19,27 \pm 0,37$  mg ERU/g) и метанолски екстракт лишаја *P. acetabulum* ( $15,42 \pm 0,55$  mg ERU/g).
- Укупни антиоксидативни капацитет екстраката лишајева био је опсегу  $25,36$  до  $74,29$  mg AA/g. Највећи антиоксидативни капацитет имао је метанолски екстракт *P. acetabulum* ( $74,29 \pm 1,36$  mg AA/g), што је у сагласности са испитивањем укупног фенолног садржаја.
- Испитивани екстракти лишајева показали су способност неутрализације DPPH• радикала, при чему је највећу способност испољио метанолски екстракт лишаја *P. acetabulum* ( $IC_{50} = 48,52 \pm 0,77$   $\mu$ g/ml), а најслабији ефекат показао је метанолски екстракт *C. subulata* ( $IC_{50} = 296,75 \pm 0,61$   $\mu$ g/ml).
- Резултати испитивања су показали да екстракти лишајева имају и способност неутралисања OH• радикала, али при већим концентрацијама екстраката. Најбољи ефекат неутралисања OH• радикала показао је метанолски екстракт *P. semipinnata* ( $IC_{50} = 163,83 \pm 0,95$   $\mu$ g/ml).
- Јачина редукујућег капацитета испитиваних екстраката лишајева опадала је по редоследу: метанолски екстракт *P. acetabulum* > ацетонски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски екстракт *P. acetabulum* > метанолски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски екстракт *C. subulata* > метанолски екстракт *C. subulata*.
- Потенцијал инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката лишајева креће се у опсегу  $IC_{50}$  вредности од  $74,30 \pm 1,48$  до  $151,96 \pm 2,79$   $\mu$ g/ml, при чему највећу способност инхибиције липидне пероксидације (а најмању  $IC_{50}$  вредност) испољио је метанолски екстракт *P. acetabulum*.



9. Процена антитуморске активности одређена је на две ћелијске линије (HeLa S3 и LS174) у *in vitro* условима, при чему је антипролиферативна и цитотоксична активност екстраката лишајева била израженија према HeLa ћелији. Најбољу антитуморску активност према обе ћелијске линије показао је ацетонски екстракт *C. subulata*.

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

На основу добијених резултата (идентификација секундарних метаболита, укупан садржај фенола и флавоноида, антиоксидативна и антитуморска активност) се може препоставити да *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* у будућности могу наћи своју потенцијалну примену у медицини. Испољене биолошке активности су специфичне за сваку врсту и зависе од хемијског састава екстраката. Хемијски састав екстраката испитиваних лишајева се разликовао у зависности од примењеног растварача (ацетон или метанол) за екстракцију. Испољене биолошке активности у *in vitro* условима дају оправданост даљег испитивања активности екстраката ових врста у моделима *in vivo*. Фитохемијском анализом лишајних метаболита расте могућност да се пронађе ново, биолошки и фармаколошки активно једињење.

## 2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати овог истраживања су објављени у часопису од међународног значаја, категорије M23. Планирано је да остали резултати буду такође презентовани у научним часописима, као и на научним и стручним скуповима у форми усмене или постер презентације.

## ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Јовице Томовића под насловом **“Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*”**, на основу свега наведеног, сматра да је истраживање у оквиру тезе засновано на савременим сазнањима и прецизно осмишљеној методологији, и да је адекватно и прецизно спроведено.

Комисија сматра да ова докторска дисертација кандидата Јовице Томовића, урађена под менторством проф. др Недељка Манојловића, представља оригинални научни допринос и од великог је научног и практичног значаја за разумевање хемијског састава, антиоксидативне и антитуморске активности екстраката врста лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* 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 антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*”** кандидата Јовице Томовић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

**Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,  
председник

Драган Миловановић

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

П. Васиљевић

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

Марија Миловановић

У Крагујевцу, 18.06.2018. године