

Наставно-научном већу Технолошког факултета у Лесковцу

Одлуком Наставно-научног већа Технолошког факултета у Лесковцу 04 бр. 4/14-V од 23.02.2015. год., именовани смо у Комисију за оцену и одбрану докторске дисертације Весне Савић, под насловом „Хемијски састав и фармаколошке активности воденог екстракта корена гавеза (*Symphytum officinale* L.) “

После прегледа урађене докторске дисертације, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ о оцени докторске дисертације

Кандидат Весна Савић поднела је на оцену докторску дисертацију са следећим садржајем: *Извод на српском језику* (3 стране), *Извод на енглеском језику* (3 стране), *Листа важнијих скраћеница и ознака* (1 страна), *Увод* (3 стране), *Теоријски део* (39 страна), *Експериментални део* (21 страна), *Резултати и дискусија* (47 стране), *Закључак* (3 стране), *Литература* (16 страна), *Прилог* (5 страна), *Биографија* (1 страна). Докторска дисертација има 51 графичких приказа и 26 табеларних приказа.

У оквиру **Увода** дат је осврт на употребу биљке гавез (*Symphytum officinale* L.) у традиционалној и званичној медицини. Од давнина се употребљава за лечење прелома костију, повреда и регенерацију ткива. Потврђен је његов аналгетски, антиинфламаторни и епителизантни ефекат. У биљци су осим алантоина, који се наводи као главни састојак присутне фенолне киселине, полифеноли, танини, тритерпени, полисахариди, аминокиселине, гликопептиди. Кандидат је навео да кључни конституенси екстракта гавеза одговорни за његову активност као и њихови молекуларни механизми још нису у потпуности разјашњени. Иритација коже је комплексни биолошки процес који настаје као одговор на деловање хемијских и физичких изазивача. Агенси могу да смање иритацију директно делујући на кожу, а могу и да смање иритациони потенцијал неког другог агенса. Биљни екстракти и супстанце биљног порекла на различит начин могу да остваре антииритантно деловање. Деловање зависи и од носача у који је екстракт инкорпориран. Екстракти гавеза добијени различитим поступцима екстракције са главном компонентом алантоином користе се за топикалну примену.

Основни циљеви ове дисертације су: 1) дефинисање оптималних услова екстракције укупних екстрактивних материја и алантоина из корена гавеза методом екстракције по Soxhlet-u; 2) испитивање кинетике изолације укупних екстрактивних материја и алантоина и одређивање оптималних кинетичких параметара ; 3) одређивање хемијског састава воденог екстракта корена гавеза добијеног под оптималним условима; 4) оптимизација и валидација аналитичких метода за квалитативну и квантитативну анализу биоактивних компонената и минералних материја у воденом екстракту корена гавеза добијеног при оптималним условима екстракције; 5) испитивање антиоксидативне активности воденог екстракта корена гавеза и стандардних компоненти: алантоина, рузмаринске и елагинске киселине; 6) испитивање антимикуробне активности воденог екстракта корена гавеза и стандардних компоненти : алантоина, рузмаринске и елагинске киселине; 7) испитивање деловања воденог екстракта корена гавеза и стандарда алантоина на вијабилност и пролиферацију одабраних ћелијских линија;

8) израда получврстих хидрофилних препарата за топикалну примену са инкорпорираним воденим екстрактом корена гавеза и алантоином; 9) испитивање стабилности и компатибилности хидрофилних носача хидрогела и емулзија типа У/В са емулгаторима новије генерације за израду топикалних препарата са воденим екстрактом корена гавеза и стандардом алантоина и 10) упоредно испитивање антииритантног деловања препарата са воденим екстрактом корена гавеза и стандардом алантоина у *in vivo* условима мерењем биофизичких параметара коже испитаника.

Теоријски део је подељен на десет поглавља. У првом поглављу (2.1.) дате су опште ботаничке карактеристике биљке гавез, преглед литературе у којој је описан хемијски састав биљке и фармаколошки значај. У оквиру другог поглавља (2.2.) описане су детаљно особине и деловање алантоина, биоактивне супстанце најчешће изоловане из биљке гавез. Треће поглавље (2.3.) детаљно описује налажење у биљном свету, хемијске особине и фармаколошку активност рузмаринске а четврто (2.4.) елагинске киселине. У петом поглављу (2.5.) детаљно су описане карактеристике флавоноида, њихова хемијска структура, подела и фармаколошке активности. У шестом поглављу (2.6.) говори се о значају минералних материја. Седмо поглавље (2.7.) обухвата детаљно објашњење иритације коже, процеса који се у кожи одвијају у току иритације, механизма деловања антииритантних супстанци и утицају носача код топикалних антииритантних производа. У осмом поглављу (2.8.) описани су антиоксиданси биљног порекла, њихова подела и механизам деловања. У оквиру деветог поглавља (2.9.) описана је антимикуробна активност биоактивних компоненти изолованих из биљака. У десетом поглављу (2.10.) описан је стандардни колориметријски метод одређивања преживљављања и пролиферације ћелијских линија сисара у *in vitro* условима под утицајем биолошки активних агенаса.

У **Експерименталном делу** описани су коришћени биљни материјали, растварачи и реагенси, ћелијске линије, културе микроорганизама, хемикалије потребне за израду хидрофилних подлога, лабораторијска опрема и уређаји. Описани су поступци екстракције из корена гавеза методом по Soxhlet-у. Такође, описане су примењене методе хемијске карактеризације воденог екстракта корена гавеза : течна хроматографија под високим притаском HPLC , течна хроматографија ултрависоког притиска UHPLC , масена спектрометрија MS, оптичка емисиона спектрометрија са индуковано спрегнутом плазмом ICP-OES. Описане су методе за одређивање укупних фенола и флавоноида у воденом екстракту корена гавеза. Детаљно је описана израда получврстих хидрофилних подлога које су служиле као носачи за биоактивне компоненте. Дати су и поступци за испитивање антиоксидативне, антимикуробне и пролиферативне активности биљних екстраката и стандарда алантоина, рузмаринске и елагинске киселине. Описана је метода која се изводи у *in vivo* условима за одређивање антииритантне активности.

У поглављу **Резултати и дискусија** најпре је приказана оптимизација процеса екстракције на основу садржаја алантоина у воденом екстракту корена гавеза. Садржај алантоина је одређиван валидираном HPLC методом. Оптимизацијом екстракције предложени су следећи услови : хидромодул 1:10 m/v и време екстракције 240 минута при којима је у екстракту одређен највећи садржај алантоина 8,91 g/100 g сувог екстракта . Методом течне хроматографије показано је да су у воденом екстракту корена гавеза присутна осим алантоина и друга једињења. За анализу квалитативног и квантитативног састава добијеног воденог екстракта корена гавеза примењена је савремена UHPLC–DAD–HESI–MS метода. UHPLC хроматографском методом у

воденом екстракту корена гавеза раздвојено је укупно 15 компонената од којих је идентификовано 12. Потврђен је садржај алантоина а на основу одговарајућих стандарда и калибрационих криви у воденом екстракту корена гавеза одређен је садржај елагинске киселине (7,4 g/100 g сувог екстракта) и рузмаринске киселине (12,8 g/100 g сувог екстракта). Садржај укупних фенола и укупних флавоноида одређен је стандардним методама и у воденом екстракту корена гавеза добијеном под оптималним условима екстракције износи 473,16 mg GKE/g s.e. (mg галне киселине еквивалената по граму сувог екстракта) и 18,90 mg RE/g s.e., респективно (mg рутин еквивалената по граму сувог екстракта). Кандидат је навео да су фармаколошке активности корена гавеза вероватно последица синергистичког деловања фитохемикалија међу којим значајно место имају феноли и флавоноиди.

Валидираном методом на апарату ICP-OES извршена је квали и квантитативна анализа воденог екстракта корена гавеза на садржај микро и макро елемената. На основу добијених резултата закључујемо да је корен гавеза богат у погледу њиховог садржаја.. Детектовано је присуство 18 елемената од анализираних 23. Минерални састав воденог екстракта корена гавеза показује релативно висок садржај К (560,4 mg/dm³) и Са (129,3 mg/dm³).

Израђене получврсте хидрофилне подлоге типа гела и крема служиле су као носачи у које су инкорпорирани екстракт и стандард алантоин. Карактеризацијом на поларизационом микроскопу крема уочене су стабилизационе структуре течно кристалне и α -кристалне гел фазе нарочито код крема са сувом дисперзијом екстракта корена гавеза, што говори да екстракт додатно стабилизује подлогу.

Испитивање фармаколошких дејстава воденог екстракта корена гавеза у *in vitro* условима обухватило је испитивање антиоксидативне, антимикробне и пролиферативне активности стандардним тестовима. Антиоксидативну активност је показао екстракт корена гавеза, као и испитивани стандарди алантоин, рузмаринска и елагинска киселина. Алантоин није показао активност, а на основу приказаних EC₅₀ вредности за испитиване узорке може се закључити да антиоксидативна активност потиче од рузмаринске и елагинске киселине као и од других присутних полифенолних једињења. Антимикробно испитивање показује да екстракт гавеза од свих испитиваних сојева микроорганизама, бактерија и гљивица делује једино на грам-негативне бактерије *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Антимикробну активност на све испитиване сојеве микроорганизама показују рузмаринска и елагинска киселина док алантоин није показао никакву активност на све испитиване сојеве. Обзиром да су рузмаринска и елагинска киселина садржане у воденом екстракту корена гавеза антимикробна активност на грам-негативне бактерије воденог екстракта корена гавеза највероватније једним делом потиче од ових киселина.

У тестовима вијабилности и пролиферације на ћелијским линијама сисара, епителним MDCK и фибробластним L929 испитан је утицај екстракта корена гавеза и стандарда алантоина. Алантоин није деловао на вијабилност ћелија ни једне испитиване ћелијске линије. Екстракт корена гавеза је у свим испитиваним концентрацијама показао благо стимулаторни ефекат на вијабилност фибробласта, док није било промене у вијабилности епителних ћелија. Код испитивања утицаја на пролиферацију алантоин је показао инхибиторни ефекат на обе ћелијске линије. Екстракт гавеза је у већим концентрацијама Екстракт гавеза је у концентрацијама већим од 0,04 mg/cm³ деловао стимулаторно на пролиферацију L929 ћелија (фибробластних) а инхибиторно на пролиферацију епителних MDCK ћелија. Резултати добијени у *in vitro* условима тестирања воденог екстракта корена гавеза показују да он показује благ стимулаторни ефекат на вијабилност и пролиферацију фибробласта линије L929, односно има бољу биолошку активност него алантоин.

У завршној фази рада испитан је *in vivo* антииритациони потенцијал екстракта корена гавеза и алантоина инкорпорираних у полуврсте хидрофилне подлоге. Препарати су апликовани на вештачки иритирану кожу добровољаца којима је мерена промена биофизичких параметара (ЕС, ЕИ, ТЕWL). За ову врсту истраживања добијена је дозвола Етичког комитета Медицинског факултета у Нишу. Најефикаснија хидратација је постигнута употребом креме и гела са екстрактом гавеза. Сви тестирани узорци утичу на смањење еритема индекса при чему су генерално кремове били ефикаснији од гелова. Крем са екстрактом гавеза остварује ефикасније антиеритематозно деловање у односу на крем са алантоином. Промене баријерне функције коже праћене су повећањем параметра трансепидермалног губитка влаге (ТЕWL) након иритације. Ефикасније смањење ТЕWL регистровано је након примене гела са екстрактом корена гавеза у односу на одговарајуће кремове. Резултати добијени на *in vitro* моделу са анализом епителне и фибробластне линије су у корелацији са клиничким налазима антииритантног ефекта екстракта корена гавеза инкорпорираних у кремове и геле.

У **Закључку** су концизно изнети постигнути резултати истраживања, који одговарају постављеним циљевима дисертације. Кандидат је истакао развој и валидацију HPLC метода за одређивање садржаја алантоина у воденом екстракту корена гавеза. Истакнут је утицај оперативних услова: времена екстракције и односа биљне сировине и воде на садржај укупних екстрактивних материја и алантоина. Дефинисани су оптимални услови екстракције. Одређен је садржај укупних фенола и флавоноида одговарајућим методама. Валидирана је савремена UHPLC–DAD–HESI–MS метода којом су осим алантоина детектоване и друге биоактивне компоненте а одређен садржај рузмаринске и елагинске киселине. Садржај микро и макро елемената у воденом екстракту корена гавеза добијен при оптималним условима екстракције одређен је применом ICP-OES методе. Стандардним поступком израђене су хидрофилне подлоге у које су инкорпорирани екстракт и алантоин. Потврђена им је стабилност. На основу података о антиоксидативној, антимикробној и пролиферативној активности екстракта гавеза и биоактивних компоненти детектованих у њему дефинисана је њихова фармаколошка активност. Укупни резултати спроведених испитивања указују да се биолошка ективност воденог екстракта корена гавеза не може приписати само чистом алантоину, као важном конституенсу екстракта корена гавеза већ да је активност резултат интеракције различитих активних једињења присутних у екстракту. Топикални препарати са воденим екстрактом корена гавеза као активном компонентом могу имати велику примену у лечењу иритиране коже.

МИШЉЕЊЕ КОМИСИЈЕ

Резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају оригинални научни допринос изолацији и квантификацији биоактивних супстанци из корена гавеза. Научни допринос посебно је усмерен на оптимизацији поступака екстракције из корена гавеза и валидацији метода квантификације биоактивних компоненти и минералних материја у воденом екстракту корена гавеза.

Упоређене су фармаколошке активности (антиоксидативна, антимикробна, пролиферативна) екстракта корена гавеза и биоактивних компоненти детектованих и квантификованих у њему. Антииритантна активност екстракта корена гавеза упоређена је са алантоином тако што су на вештачки иритирану кожу испитаника апликовани препарати са екстрактом и алантоином инкорпорираним у стабилне хидрофилне носаче. Ови резултати дају значајан допринос развоју метода за изолацију, детекцију и квантификацију биоактивних компоненти из корена гавеза. Разрађене су методе за одређивање фармаколошких активности екстракта у *in vivo* и *in vitro* условима. Поред научног доприноса, резултати презентовани у овој дисертацији имају и апликативни значај за израду фармацеутских формулација са потенцијалним антииритантним деловањем.

Весна Савић је објавила један рад у истакнутом међународном часопису (M₂₂), један рад у часопису међународног значаја (M₂₃), једно саопштење на научном скупу међународног значаја штампано у изводу (M₃₄), два рада у часописима националног значаја (M₅₂) и пет саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M₆₄) у којима су изнети резултати докторске дисертације.

ЗАКЉУЧАК

На основу изнетих чињеница Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације са задовољством предлаже Наставно-научном већу Технолошког факултета у Лесковцу да усвоји Извештај за оцену и одбрану докторске дисертације и одобри одбрану докторске дисертације кандидата Весне Савић, под насловом „Хемијски састав и фармаколошке активности воденог екстракта корена гавеза (*Symphytum officinale* L.) “Комисија у саставу:

.....
Др Валентина Маринковић, доцент, с.р.
Фармацеутски факултет, Београд, Универзитет у Београду,
Председник

.....
Проф.др Весна Николић, с.р.
Технолошки факултет, Лесковац, Универзитет у Нишу,
Ментор

.....
Проф.др Стево Најман, с.р.
Медицински факултет, Ниш, Универзитет у Нишу,
Члан

.....
Др Љиљана Станојевић, доцент, с.р.
Технолошки факултет, Лесковац, Универзитет у Нишу,
Члан

.....
Др Драган Цветковић, доцент, с.р.
Технолошки факултет, Лесковац, Универзитет у Нишу,
Члан

СПИСАК РАДОВА ВЕСНЕ САВИЋ
У КОЈИМА СУ ОБЈАВЉЕНИ РЕЗУЛТАТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Рад у истакнутом међународном часопису М22

1. **Vesna Lj. Savić**, Vesna D. Nikolić, Ivana A. Arsić, Ljiljana P. Stanojević, Stevo J. Najman, Sanja Stojanović, Ivana I. Mladenović-Ranisavljević, COMPARATIVE STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALLANTOIN AND AQUEOUS EXTRACT OF THE COMFREY ROOT (*SYMPHYTUM OFFICINALE* L.) *Phytotherapy Rresearch*, in press, DOI: 10.1002/ptr.5356.

Рад у међународном часопису М23

1. **Savić Vesna**, Savić Saša, Nikolić Vesna, Nikolić Ljubiša, Najman Stevo, Lazarević Jelena, Đorđević Aleksandra, The identification and quantification of bioactive compounds from the aqueous extract of comfrey root by UHPLC-DAD-HESI-MS method and its microbial activity, *Hemijska industrija*, 69(1) (2015) 1-9.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу М34

1. Marija Tasić-Kostov, **Vesna Savić**, Vanja Tadić, Ivana Arsić, Sofija Đorđević, Dušanka Runjaić-Antić, Nataša Blažević-Kamenov, Snežana Savić, *In vivo* effects of the creams containing mud from Banja Vrujci and plant extracts on surfactant-irritated skin, 8th EADV Spring Symposium, Carlsbad, Chez Republic, P109 (2011)

Радови у часописима националног значаја М 52

1. Ivana Arsić, Vanja Tadić, Marija Tasić-Kostov, **Vesna Savić**, Nataša Blažević-Kamenov, Sofija Đorđević, Dušanka Runjaić-Antić, Ispitivanje antiirritantnog i vlažećeg efekta krema sa biljnim ekstraktima na veštački iritiranu kožu, *Arhiv za farmaciju*, 5 (2010) 786-787

2. **Vesna Savić**, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Dušica Ilić, Biljana Stanković, Milorad Cakić, Ljubiša Nikolić, Kinetika ekstrakcije i antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta iz korena gaveza (*Symphytum Officinale* L.), Savremene tehnologije 1(2) (2012) 41-47.

Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу М64

1. Dragana Stojiljković, Marija Tasić-Kostov, **Vesna Savić**, Ivana Arsić, Snežana Savić, Uticaj različitih emolijenasa na strukturu i vlažeći potencijal kremova stabilizovanih fazom tečnih kristala; 18 Kongres udruženja dermatovenerologa Srbije sa internacionalnim učešćem, Beograd 4-6. 6. 2009. Zbornik radova, (PP19).

2. Marija Tasić-Kostov, Dragana Stojiljković, **Vesna Savić**, Ivana Arsić, Snežana Savić, Uticaj različitih emolijenasa na strukturu i vlažeći potencijal kremova stabilizovanih GMSse, VIII Simpozijum Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, 23-24.oktobar 2009. Tehnološki fakultet Leskovac, Zbornik izvoda radova, OHT-12/OCT-12, str. 102.

3. Milica Stanković, **Vesna Savić**, Valentina Marinković, Legislation and recommendations of the european union in determining the irritation potential of cosmetic ingredients, Macedonian Pharmaceutical Bulletin 2011; 57 (suppl), Fifth Congress Of Pharmacy Of Macedonia With International Participation, Ohrid, Macedonia, 21.-25. September 2011, str. 263.

4. **Vesna Savić**, Jelena Lazarević, Aleksandra Đordjević, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Antimikrobna aktivnost vodenog ekstrakta korena gaveza (*Symphythum officinalae*) dobijenog soxhlet ekstrakcijom, X Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Tehnološki fakultet Leskovac, 22-23.10.2013., Zbornik izvoda radova, BPT-1, str. 51.

5. **Vesna Savić**, Ivana Arsić, Milica Stanković, Ana Tačić, Vesna Nikolić, Dugotrajna *in vivo* studija o uticaju gela sa ekstraktom gaveza (*Symphythum officinalae*) na vlažnost kože, X Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Tehnološki fakultet Leskovac, 22-23.10.2013., Zbornik izvoda radova, OHT-4, str. 102.