

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Датум и орган који је именовао комисију 23.05.2013, Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду, IX седница</li><li>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:<ol style="list-style-type: none"><li>1. Др Неда Мимица-Дукић, редовни професор, Биохемија, 01.08. 2003, ПМФ у Новом Саду – члан</li><li>2. Др Мира Поповић, редовни професор, Општа хемија, 29.02.2000, ПМФ у Новом Саду – председник</li><li>3. Др Биљана Кауриновић, доцент, Општа хемија, 01.03. 2011, ПМФ у Новом Саду – члан</li><li>4. Др Милан Поповић, редовни професор, Биохемија, Пољопривредни факултет у Новом Саду – члан</li><li>5. Др Драгољуб Цветковић, доцент, Микробиологија, 25.02.2010, Технолошки факултет у Новом Саду - члан</li></ol></li></ol>
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Име, име једног родитеља, презиме: Влаисављевић, Стево, Сања</li><li>2. Датум рођења, општина, држава: 15.08.1983, Загреб (Максмир), Република Хрватска</li><li>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив: Природно-математички факултет, Хемија, Дипломирани хемичар - биохемичар</li><li>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: 2008, Биохемија</li><li>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -</li><li>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -</li></ol>
<b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b> Хемијска, биохемијска и микробиолошка карактеризација <i>Trifolium pratense</i> L.
<b>IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b> Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.
Докторска дисертација се састоји из осам делова: увод, општи део, експериментални део, резултати и дискусија, закључак, summary, литература и прилог. Има 159 страна са 44 страна прилога. Садржи 30 хистограма, 170 табела и 34 слике. Увод садржи 3 стране, општи део 46 страна, експериментални део 28 стране, резултати истраживања и дискусија 43 стране, закључак 5 страна, summary 3 стране и литература 26 страна са 311 литературна навода. У уводу је дат кратак преглед коришћења лековитог биља у народној медицини и постављени су циљеви који обухватају хемијска, биохемијска и микробиолошка истраживања у народу често коришћене, а недовољно испитане биљке <i>Trifolium pratense</i> L. (црвена детелина).

У општем делу детаљно је описан кисеоник као извор слободних радикала, његов метаболизам и токсичност радикала. Потом је дат преглед система антиоксидативне заштите (ензимске и неензимске). Осим тога, дат је преглед најзначајних активних принципа биљака као што су: феноли и етарска уља и подгрупе у оквиру ових класа. На крају општог дела, дат је опис фамилије којој *Trifolium pratense* L. припада, фитохемијски састав црвене детелине, као и њен фармаколошки значај.

У поглављу експериментални део детаљно је описана припрема етарских уља асистираним микроталасном хидродестилацијом, као и сирових метанолних екстраката лишћа црвене детелине из којих је sukcesивном екстракцијом етром, хлороформом, етилацетатом, и n-бутанолом добијено пет различитих екстраката (остатак је водени екстракт). Приказана је метода одређивања састава етарског уља гасном хроматографијом са спектрометријом маса (GC-MS анализа). Такође је приказана метода одређивања састава екстраката LC-MS/MS методом и количине садржаја укупних фенола и флавоноида у биљци и појединачним екстрактима. Одређиван је утицај етарских уља и екстраката на интензитет липидне пероксидације и настајање OH<sup>•</sup> радикала. Осим тога, одређиван је утицај етарских уља и екстраката на неутрализацију O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, NO<sup>•</sup> и DPPH<sup>•</sup> радикала и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, као и редокс капацитет екстраката и етарских уља FRAP методом и методом по Yen-Chen-у. Одређиван је утицај екстраката на следеће биохемијске параметре: активности глутатион пероксидазе (GSHPx), глутатион редуктазе (GSHR), пероксидазе (Px), каталазе (CAT), ксантин оксидазе (XOD), као и садржај редукованог глутатиона (GSH) и интензитет липидне пероксидације (Lpx) као маркера оксидативног оштећења јетре. Експерименти су рађени *in vitro* и *in vivo*. Веома исцрпно је описан третман експерименталних животиња при биохемијским испитивањима. Поред тога, извршено је испитивање естрогене, антиестрогене и цитотоксичне активности екстраката, као и антимицробне активности екстраката и етарских уља.

У поглављу резултати и дискусија приказани су резултати испитивања садржаја укупних фенола и флавоноида и количине етарских уља. Приказани су резултати GC-MS анализе етарских уља, као и резултати LC-MS/MS анализе екстраката црвене детелине. Приказани су резултати *in vitro* деловања етарских уља и екстраката црвене детелине на интензитет липидне пероксидације и настајање OH<sup>•</sup> радикала. Такође, приказан је утицај етарских уља и екстраката на неутрализацију O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, NO<sup>•</sup> и DPPH<sup>•</sup> радикала и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, као и редокс капацитет етарских уља и екстраката FRAP методом и методом по Yen-Chen-у. Од биохемијских испитивања *in vivo* испитивано је деловање екстраката листа и плода ловора и листа меденике на активност ензимских антиоксидативних система, на садржај редукованог глутатиона, и на интензитет липидне пероксидације. Добијени резултати су продискутовани и упоређени са одговарајућом литературом. Такође су приказани резултати добијени приликом испитивања естрогене, антиестрогене и цитотоксичне активности екстраката, као и антимицробне активности екстраката и етарских уља.

У закључку су веома детаљно изнети резултати хемијских, биохемијских и микробиолошких истраживања.

Литература садржи најзначајније референце из области која је истраживана укључујући и најновија истраживања.

У прилогу су дати комплетни резултати GC-MS анализе летљивих компонената и LC-MS/MS скрининга фенолних једињења, као и табеларни приказ свих резултата из којих су израчунате вредности антиоксидантних параметара, као и параметара естрогене, антиестрогене, цитотоксичне и антимицробне активности.

## V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Увод је дат на четири стране. Објашњена је суштина и циљеви истраживања на веома коректан начин. У општем делу детаљно су приказани оксидативни стрес; липидна пероксидација; ензимски и неензимски системи антиоксидативне заштите; активни принципи у биљкама (феноли и њихови деривати, етарска уља); фитохемијски и медицински значај црвене детелине. У поглављу експериментални део су описане методе екстракције биљног материјала, као и у литератури верификоване методе коришћене у овом раду. Примењене су оригиналне и иновирани методе у биохемијској аналитици за одређивање активности ензима. Примењене методе су високо репродуктивне. У поглављу резултати и дискусија, детаљно (уз одговарајући преглед литературе) су продискутовани добијени резултати хемијских, биохемијских *in vitro* и *in vivo* истраживања, као и микробиолошких истраживања. У анализи резултата коришћене су графичке и статистичке методе. Тестирање статистичке значајности разлика између средњих вредности вршено је Студентовим т-тестом за мало зависне и независне узорке. У поглављу литературе наведене су референце које се баве проблематиком овога рада, почев од основних референци па до најновијих истраживања.

## VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

1. **Vlaisavljevic, S**, Kaurinovic, B, Popovic, M, Djurendic-Brenesel, M, Vasiljevic, B, Cvetkovic, D, Vasiljevic, S. (2014): *Trifolium pratense* L. as a Potential Natural Antioxidant. *Molecules*, **19**: 713-725. **M<sub>22</sub>**
2. Kaurinovic, B, Popovic, M, **Vlaisavljevic, S**, Schwartzova, H, Vojinovic-Miloradov, M. (2012): Antioxidant Profile of *Trifolium pratense* L., *Molecules*, **17**:11156-11172. **M<sub>22</sub>**
3. **Vlaisavljević, S**, Kaurinović, B, Popović, M, Rašeta, M, Kerbert, M. Evaluation of chemical composition and biological activity of *Trifolium pratense* L. Leaf extract. X susret mladih kemijskih inženjera Nove Tehnologije i transfer znanja, 20-21.02.2014. Zagreb, Croatia, 193. **M<sub>34</sub>**
4. **Vlaisavljevic, S**, Kaurinovic, B, Popovic, M. Antioxidant profile of Red clover (*Trifolium pratense* L). 4<sup>th</sup> EuCheMS Chemistry Congress, 26.-30.08.2012. Prague, Czech Republic, s901. **M<sub>34</sub>**
5. **Vlaisavljević, S**, Kaurinović, B, Popović, M, Kerbert, M. Antioxidant activity of predominant compounds from *Trifolium pratense* L. Leaf extract. IX susret mladih kemijskih inženjera Nove Tehnologije i transfer znanja, 16-17.02.2012. Zagreb, Croatia, 174. **M<sub>34</sub>**

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

- LC-MS/MS техником је утврђено присуство изофлавоноида даиздеина и генистеина, као и других фенолних једињења (p-хидроксибензоеве киселине, кафене киселине, камферол-3-О-глукозида, кверцетин-3-О-глукозида, хиперозида и ескулетина).
- GC-MS анализом етарских уља идентификовано је 39 различитих летљивих једињења од којих се издвајају нетерпенски угљоводоници: алдехиди, кетони, алкохоли и терпени: моно-, ди- и терпеноиди.
- Етилацетатни, водени екстракт и етарско уље црвене детелине у најнижој фази раста (TP1) показали су најбољи антиоксидантни ефекат при неутрализацији DPPH радикала.
- Етилацетатни, водени екстракти и етарско уље узорка TP1 показали највећи антиоксидантни капацитет при неутрализацији OH<sup>•</sup> радикала.
- Водени екстракт и етарско уље узорка TP1 (су показали најбољу антиоксидантну активност при неутрализацији O<sub>2</sub><sup>-•</sup> радикала).
- Етилацетатни, n-бутанолни екстракти и етарско уље узорка TP1 су показали снажну и приближно исту антиоксидантну активност при неутрализацији H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Највећу способност инхибиције Fe<sup>2+</sup>/аскорбат индуковане липидне пероксидације показали су

метанолни екстракт и етарско уље узорка TP1.

- Сви екстракти и етарска уља су показали висок редукциони потенцијал применом обе методе.
- Метанолни и етилацетатни екстракти узорка TP1, TP2 и TP3 садрже највише фенолних једињења, при чему се издвајају екстракти узорка TP1.
- Метанолни екстракти TP1, TP2 и TP3 поседују највећи садржај укупних флавоноида, при чему се издваја вредност узорка TP1.

Резултати одређивања биохемијских параметара из *хомогената* јетре животиња третираних екстрактима црвене детелине су:

- садржај GSH су статистички значајно смањили сви екстракти црвене детелине, без и у третману са CCl<sub>4</sub>;
- активност GSHPx су смањили сви екстракти црвене детелине, без и у третману са CCl<sub>4</sub>;
- етилацетатни екстракт је повећавао активност GSHR, насупротив етарском и хлороформском екстракту који су инхибирали активност овог ензима, док је његова активност у комбинацији са CCl<sub>4</sub> је статистички значајно смањена при деловању етарског и етилацетатног екстракта;
- сви екстракти црвене детелине, осим хлороформског, су смањили интензитет LPx, а у комбинацији са CCl<sub>4</sub> су испољили протективни ефекат;
- пероксидазну активност су смањили сви екстракти изузев воденог екстракта. У третману са CCl<sub>4</sub>, етилацетатни екстракт је повећао активност овог ензима;
- каталазна активност је смањена при третману са етарским и хлороформским екстрактима, док остала три екстракта (етилацетатни, бутанолни и водени екстракт) повећавају активност овог ензима. Третман екстракта са CCl<sub>4</sub> је смањено активност каталазе;
- на активност XOD инхибиторно су деловали сви екстракти црвене детелине, док су у третману са CCl<sub>4</sub> сви екстракти повећали активност овог ензима.

Резултати одређивања биохемијских параметара из *хемолизата* јетре животиња третираних екстрактима црвене детелине су:

- сви екстракти црвене детелине смањили су садржај GSH. Третман са CCl<sub>4</sub> је такође смањено вредност GSH, а у комбинацији са екстрактима још значајније.
- сви екстракти су смањили GSHPx без и са третирањем са CCl<sub>4</sub>;
- третман са етилацетатним екстрактом показао је статистички најзначајније повећање GSHR, док је његова активност значајно смањена третирањем са етарским и етилацетатним екстрактом. Активност GSHR у комбинацији са CCl<sub>4</sub> је статистички значајно смањена при деловању етарског и етилацетатног екстракта;
- сви, осим етарског екстракта, су довели до значајног смањења липидне пероксидације. Третман са CCl<sub>4</sub> повећао је интензитет LPx, више него у хомогенату;
- етилацетатни екстракт је показао значајније смањење активности Px, без и са третирањем са CCl<sub>4</sub>, у односу на преостале екстракте;
- третман са етилацетатним екстрактом, изазвао је најзначајније повећање активности CAT, а у комбинацији етилацетатни екстракт+CCl<sub>4</sub>, забележено је највеће смањење активности овог ензима;
- највеће смањење XOD изазива третман са етилацетатним екстрактом, док је у комбинацији са CCl<sub>4</sub> овај екстракт утицао на повећање XOD.

Испитивањем микробиолошке активности на шест бактеријских сојева (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*) екстракта и етарских уља *T. pratense*, утврђено је да ниједан узорак није показао антимикуробну активност.

Испитивањем естрогене, антиестрогене и цитотоксичне активности екстракта *T. pratense* праћењем процента индукције алкалне фосфатазе у ћелијској линији Ishikawa, добијени су следећи резултати:

- Етилацетатни и етанолни екстракт TP1 узорка показују најбољу естрогену активност.
- Ниједан од узорка није испољио антиестрогену активност према испитаним ћелијама.
- Ниједан од екстракта није показао цитотоксичну активност према Ishikawa ћелијској линији.

Из добијених резултата у овој докторској тези, могао би се извести општи закључак, а то је да црвена детелина услед значајног садржаја биоактивних једињења, добро показаног антиоксидантног капацитета, као и естрогене активности, представља потенцијални извор природне и функционалне хране, односно суплемента у људској исхрани.

**VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Резултати истраживања су добро дефинисани, прегледно приказани и упоређени са резултатима других аутора уз критичан осврт. За резултате, за чија поређења има мало или нема уопште литературних података, кандидат је јасно и аргументовано изнео сопствена теоријска објашњења.

**IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме **ДА**

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе **ДА**

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

На основу детаљног увида у докторску дисертацију и анализе обрађене проблематике истраживања, као и на основу добијених резултата ова дисертација представља оригинални научни рад и значајан допринос познавању дејства црвене детелине (*Trifolium pratense* L.). С обзиром на присуство многих биоактивних једињења, снажан антиоксидантни ефекат и естрогену активност, црвена детелина и фитопрепарати базирани на овој биљци, могли би наћи ширу примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања **НЕМА**

<b>X ПРЕДЛОГ:</b>
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
- Да се докторска дисертација „Хемијска, биохемијска и микробиолошка карактеризација <i>Trifolium pratense</i> L.“ прихвати, а кандидату Сањи Влаисављевић одобри одбрана

НАВЕСТИ ИМЕ И ЗВАЊЕ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ  
ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

---

председник комисије

Др Неда Мимица-Дукић, редовни професор  
ПМФ-а у Новом Саду

---

члан 1

Др Мира Поповић, редовни професор ПМФ-а у  
Новом Саду

---

члан 2

Др Биљана Кауриновић, доцент ПМФ-а у Новом  
Саду

---

члан 3

Др Милан Поповић, редовни професор  
Пољопривредног факултета у Новом Саду

---

члан 4

Др Драгољуб Цветковић, доцент  
Технолошког факултета у Новом Саду

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.