

Наставно-научном већу
Технолошког факултета у Лесковцу

Одлуком Наставно-научног већа Технолошког факултета у Лесковцу, Универзитета у Нишу, број 4/121-XVII од 23.11.2015. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану урађене докторске дисертације под називом „СТАБИЛНОСТ ХЛОРОФИЛА НА ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У ВОДЕНОМ МЕДИЈУМУ И У ЛИПОЗОМИМА“, а коју је поднео кандидат Сања Петровић, дипл. инг. технологије, студент докторских студија Технолошког факултета у Лесковцу. На основу прегледа дисертације подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ
о оцени докторске дисертације

Кандидат Сања Петровић (у даљем тексту: кандидат) поднела је на оцену докторску дисертацију са следећим садржајем: *Листа релевантних скраћеница и симбола* (5 страна), *Резиме* (2 стране), *Abstract* (на енглеском језику- 2 стране), *Увод* (3 стране), *Општи део* (40 страна), *Мотив рада* (1 страна), *Циљ дисертације* (1 страна), *Експериментални део* (21 страна), *Резултати и дискусија* (79 страна), *Закључци* (укључујући *Завршни закључак* - 4 стране), *Литература* (21 страна), *Анекс* (3 стране), *Општи Биографски подаци* (2 стране) и *Библиографија* (5 страна). Докторска дисертација садржи 91 слику (укључујући и графичке приказе) и 19 табела.

У оквиру *Увода* указано је на значај истраживања везаних за проблематику која је обрађена у докторској дисертацији. Истакнута је важност хлорофила (Chl) који представља једно од најважнијих био-органичких једињења уопште, пре свега због његове централне улоге коју има у процесу фотосинтезе, најважнијем глобалном физичко-хемијском процесу на нашој планети. Улога хлорофила заснована на специфичној и врло разноврсној хемијској реактивности оправдава његову примену у индустријским технологијама, прехранбеној и фармацеутско-козметичкој индустрији, али и у медицини. Хемијске промене на молекулу хлорофила уз потенцијално стварање оксидационих-деградационих продуката, а које су директна последица његове (не)стабилности у *in vitro* условима, утичу на могућност његове потенцијалне примене у разним областима науке и технологије. У *Уводу* је дат између осталог и основни преглед структура хлорофила и неких његових деривата. Формулисани су циљеви рада који се састоје у испитивању стабилности хлорофила на оксидационе стресове *in vitro*: хемијска оксидација Фентоновим реагенсом и термалним иницијатором, ензимски катализована оксидација, фотооксидација видљивим VIS и UV-B зрачењем, као и формирање

могућих оксидационих продуката хлорофила, како у воденом медијуму, тако и у липозомима.

Експериментални део садржи детаљан опис реакција оксидације у води и у липозомима. Поред тога, детаљно је описан поступак изолације хлорофила, припреме липозома, инкорпорације хлорофила у липозоме, као и методе одређивања величине и стабилности припремљених липозомних дисперзија са инкорпорисаним хлорофилом. Кроз ово поглавље дат је преглед хроматографских метода (HPLC и UHPLC) у комбинацији са VIS и MS-детекцијом, а које су коришћене за сепарацију и идентификацију насталих производа у реакцијама оксидације хлорофила, као и метода апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије.

Поглавље **Резултати и дискусија** садржи табеларни и графички приказ резултата докторске дисертације. Кандидат је поделио добијене резултате у две целине, водени медијум и липозоме, како би могао да процени евентуални заштитни ефекат липозома (на стабилност), или прецизније речено да оцени утицај молекуларне организације околине на ефекте оксидационог стреса којима је изложен хлорофил. При томе треба истаћи да се под термином (водени) „медијум“ у случају хлорофила не мисли искључиво на „хомогени раствор“ (са униформном дистрибуцијом свих молекула) већ и на хетерогене системе, с обзиром на познату склоност хлорофила да, због слабе растворљивости у води, гради „асоцијате“, тј. агрегате; у том смислу предложени термин (из наслова дисертације) - „медијум“ - се чини одговарајућим. Са друге стране, поглавље је презентовано практично кроз три дела. У првом су дати резултати оксидације хлорофила на одабране стресове у воденом медијуму. Стабилност хлорофила у воденом медијуму након оксидационих стресова, праћена је применом апсорпционе VIS спектрофотометрије, док су за прецизнију детекцију промена у структури Chl-молекула коришћене технике електро-спреј масене спектрометрије комбиноване са UHPLC хроматографијом, са циљем могућег увида у механизме деградације. Поред тога, у табелама су приказани називи идентификованих једињења која се стварају као производи оксидације хлорофила при чему је део претпостављених реакција приказан у *Анексу*. У другом делу је испитивана инкорпорација хлорофила у липозоме различитих величина као и његова оријентација у самом двослоју засићених и незасићених липида. Промене физичког стања унутрашњости липозома условљене структуром липида, а које утичу на пенетрацију и понашање инкорпорисаног хлорофила, самим тим и на другачији степен његове деградације, испитане су применом апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије у липозомима засићених и незасићених липида. У трећем делу испитивана је стабилност хлорофила на одабране оксидационе стресове, у липозомима након инкорпорације. Са циљем процене неких могућих механизма укључених

у оксидационе стресове, поред већ представљених метода, дати су и резултати тзв. пероксидних тестова (тест коњугованих диена и ТВА-MDA тест). Добијени резултати су приказани графички и табеларно.

У поглављу **Закључци** сумарно су приказани најважнији резултати докторске дисертације:

1. На основу резултата добијених апсорпционом VIS спектрофотометријом констатована је већа стабилност хлорофила у липозомима него у воденој средини током периода стајања у мраку и на температури од око 4°C . Такође је примећена разлика у организацији Chl-молекула у води и у липозомима.
2. Промене физичког стања унутрашњости липозома које су условљене структуром липида (засићени и незасићени липиди) утичу на пенетрацију и понашање инкорпорисаних хлорофила.
3. Фото(не)стабилност хлорофила на VIS и UV-B третман условљена је јачином енергије зрачења, медијумом у коме се хлорофил налази и његовом концентрацијом. Стрес изазван континуалним UV-B озрачивањем, деструктивнији је у односу на VIS оксидациони стрес. Системи липозома са инкорпорисаним хлорофилом показали су се нестабилнијим према фотооксидацији у односу на водени медијум, што би могла да буде индикација веће количине генерисаних реактивних кисеоничних, тј. ROS-врста под дејством зрачења у липозомима у односу на водени медијум.
4. Испитивањем стабилности хлорофила на дејство Фентоновог реагенса у воденом медијуму примећен је већи степен деградације при већим концентрацијама пигмента. У случају овог стреса примећен је већи проценат деградације хлорофила у воденом медијуму у односу на липозоме.
5. Деградација хлорофила дејством термалног иницијатора у води зависна је од концентрације иницијатора и хлорофила. Са повећањем концентрације хлорофила расте и степен његове деградације. У липозомима није уочена битнија разлика у погледу степена деградације дејством AAPH (хидрофилног иницијатора) у односу на водени медијум. Са друге стране, за разлику од водорастворног AAPH, липоидни термални иницијатор, AMVN, генерише пероксидне радикале у самом липидном двослоју, што вредности деградације хлорофила знатно повећава. Може се рећи да липоидни AMVN деловањем и на саме липиде липидног двослоја, као и директно на Chl-молекуле инкорпорисане у липидни двослој, несумњиво доприноси већој деградацији хлорофила.
6. На основу урађених пероксидних тестова, за системе липозома са инкорпорисаним хлорофилом пре и после дејства свих оксидационих стресова примећених у овом

раду, уочен је већи проценат награђених пероксида у липозомима који у свом саставу садрже више од 50 % незасићених липида (PL-90 смеша липида) у односу на липозоме направљене од засићених липида (DPPC). Два главна фактора који „производе“ овај ефекат су ROS врсте – и уопште присуство кисеоника у липозомима – као и сама структура липида, односно присуство двоструких веза у њима, јер оне пресудно доприносе лакшем стварању липидних радикала, тј. иницирању ланчаног механизма липидне пероксидације.

На основу изнетих резултата закључено је да је познавање што тачнијих механизма понашања хлорофила под дејством оксидационих стресова, као и његове оптималне концентрације и стабилности у потенцијалним формулацијама, од круцијалног значаја за његову даљу употребу.

МИШЉЕЊЕ КОМИСИЈЕ

Резултати презентовани у овој докторској дисертацији представљају оригинални научни допринос студијама које се баве утицајима различитих оксидационих стресова на хлорофил, с обзиром на значај хлорофила, његову широку употребу у фармацеутској, козметичкој индустрији и у медицини.

Кандидат је део резултата својих истраживања непосредно из области докторске дисертације објавио у међународним и националним часописима (4 рада у часописима међународног значаја, 1 рад у часопису међународног значаја верификован посебном одлуком и 1 рад у часопису националног значаја), док је део резултата саопштен на научним скуповима (6 саопштења са скупа међународног штампано у изводу и 8 саопштења са скупа националног значаја штампано у изводу), а поједини резултати су објављени у виду техничких и развојних решења (4 нова технолошка поступка и 3 нове методе).

ЗАКЉУЧАК

На основу свега напред наведеног, Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације предлаже Наставно-научном већу Технолошког факултета у Лесковцу да докторску дисертацију Сање Петровић под називом „Стабилност хлорофила на оксидациони стрес у воденом медијуму и у липозомима“, прихвати као услов за стицање научног степена доктора наука и кандидата позове на усмену одбрану.

Комисија у саставу:

проф. др Татјана Анђелковић, председник, с. р.

Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет, Ниш

др Јелена Звездановић, доц., ментор, с. р.

Универзитет у Нишу, Технолошки факултет, Лесковац

Др Драган Цветковић, доц., члан, с. р.

Универзитет у Нишу, Технолошки факултет, Лесковац

У Лесковцу,

30.11.2015.год.

СПИСАК РАДОВА КАНДИДАТА КОЈИ СУ У ВЕЗИ СА ДИСЕРТАЦИЈОМ

Рад у часопису међународног значаја (M23=3)

Рад у часопису међународног значаја (R52=3)

1. **Sanja M. Petrović**, Saša Savić, Dejan Marković, Živomir Petronijević (2014): *In vitro studies of temperature and pH influence on chlorophyll degradation by horseradish peroxidase: Spectroscopic and HPLC studies*, Chemical Industry, 68(2), 233-239.
2. **Sanja M. Milenkovic**, Marcela Barbanta-Patrascu, Gabriel Baranga, Dejan Markovic, Laura Tugulea (2013): *Comparative spectroscopic studies on liposomes containing chlorophyll a and chlorophyllide a*, General Physiology and Biophysics, 32, 559–567.
3. Jelena Zvezdanović, Dejan Marković, **Sanja M. Milenković** (2012): *Zinc (II) and copper (II) complexes with pheophytin and mesoporphyrin and their stability to UV-B irradiation: VIS spectroscopy studies*, Journal of the Serbian Chemical Society, 77(2), 187-199.
4. Jelena Zvezdanović, **Sanja M. Petrović**, Dejan Marković, Tatjana Andjelković, Darko Andjelković (2014): *Electrospray ionization mass spectrometry combined with ultra high performance liquid chromatography in the analysis of in vitro formation of chlorophyll complexes with copper and zinc*, Journal of the Serbian Chemical Society, 79(6), 689–706.

Рад у часопису међународног значаја верификован посебном одлуком (M24=3)

Рад у часопису међународног значаја верификован посебном одлуком (P52=3)

1. **Sanja M. Petrović**, Laura Tugulea, Dejan Marković, Marcela Barbinta-Patrascu: *Chlorophyll a and chlorophyllide a inside liposomes made of saturated and unsaturated lipids: a possible impact of the lipids microenvironment*, Acta Periodica Technologica, 45, 215-227.

Рад у часопису националног значаја (M52=1,5)

Рад у часопису националног значаја (R62=1,5)

1. **Sanja M. Milenković**, Jelena Zvezdanović, Tatjana Anđelković, Dejan Marković (2012): *The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies*, Advanced technologies, 1(1), 16-24.

Предавање по позиву са међународног скупа штампано у изводу (M32=1,5)

Пленарно предавање на скупу међународног значаја штампано у изводу (R71=1,5)

1. Dragan Cvetković, **Sanja M. Milenković**: *Investigation of carotenoids and chlorophylls incorporation inside liposomes*, Advanced Workshop: New Trends in Nanophysics and Solar Energy Conversion, Faculty of Physics, University of Bucharest-Magurele, Romania, p. 18, 23-25. September (2013).

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34=0,5)

Раd саопштен на скупу међународног значаја штампан у изводу (R72=0,5)

1. **Sanja M. Milenkovic**, L. Tugulea, M. Barbanta-Patrascu, G. Baranga, D. Markovic: *Spectroscopic studies on liposome containing chlorophyll a and chlorophyllide a*, 2012 Annual Scientific Conference, Bucharest, Romania, 3.17, p.64, 22-23. June (2012).
2. **Sanja M. Milenkovic**, L. Tugulea, M. Barbanta-Patrascu, G. Baranga, D. Markovic: *Quercetin Effects on Model lipid Membranes monitored by Chlorophyll Derivatives*, 12th Eurasia Conference on Chemical Sciences Corfu, Greece, S2-OP11, p.45, 16-21. April (2012).
3. Laura Tugulea, Marcela Elisabeta Barbinta-Patrascu, Gabriel Baranga, **Sanja M. Milenkovic**, Dejan Z. Markovic: *Spectroscopic studies on liposomes containing Chlorophyll a and Chlorophyllide a*, IUPAC 2013 & Solar Energy for World Peace, International Union of pure and applied chemistry, Istanbul, PC-O-09, 17-19. August (2013).
4. Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, **Sanja M. Petrović**, Jelena Stanojević, Dejan Marković: *Plant pigments interaction with UV-light: In vivo and in vitro approach*, Third

International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research (RAD 2015), Book of Abstracts, Ed. G. Ristić, p. 505. Montenegro, 8-12. Jun (2015).

5. **Sanja M. Petrović**, Jelena Zvezdanović, Dejan Marković: “*Chlorophyll and chlorophyllin degradation induced by AAPH*”, Third Congress Redox Medicine: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease, September 25-26, 2015, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, Eds. B. Korać, A. Stančić p. 82.

Предавање по позиву са скупа националног значаја штампано у целини (M61=1,5)

Уводно предавање на скупу националног значаја штампано у целини (R64=1,5)

1. Dragan Cvetković, Jelena Zvezdanović, **Sanja M. Milenković**, Jelena Stanojević, Dejan Marković: *Fotoaktivni biljni pigmenti – ingredientni u fotoprotektivnim farmaceutsko-kozmetičkim formulacijama*, VI simpozijum, Promocija zaštite od sunca kao doprinos javnom zdravlju, Medicinski fakultet u Nišu, 02. Jun (2012).

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64=0,2)

Рад саопштен на скупу националног значаја штампан у изводу (R73=0,2)

1. **Sanja M. Milenković**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *Stability studies of pheophytin and its zinc (II) and copper (II) complexes to UV-B irradiation by VIS spectroscopy*, 22nd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, A-25, p.80, 05-09 September (2012).
2. **Sanja M. Milenković**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *The stability of mesoporphyrin IX and its zinc (II) and copper (II) complexes to UV-B irradiation: VIS spectroscopy studies*, IX Simpozijum - Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem, rad: OHT–11/OCT–11, str. 87, Tehnološki fakultet Leskovac, 21-22. Oktobar (2011).

3. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović, **Tatjana D. Anđelković**, **Dejan Z. Marković**: *The identification of pheophytin obtained from a plant material by HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy*, X Simpozijum -Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem (Zbornik izvoda radova, rad: OHT–2/OCT–2, str. 100, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac 22-23. Oktobar (2013).
4. **Sanja M. Petrović**, **Saša R. Savić**, **Dejan Z. Marković**, **Živomir B. Petronijević**: *Degradation of chlorophyll a by horseradish peroxidase: identification of product and temperature influence*, X Simpozijum-Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem (Zbornik izvoda radova, rad: OHT–1/OCT–1, str. 99, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac 22-23. Oktobar (2013).
5. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *Degradacija hlorofila pod dejstvom vidljive svetlosti i uvb zračenja u vodenim sistemima in vitro i in situ-osvrt na učešće kiseoničnih slobodnih radikala*, Drugi kongres- život sa slobodnim radikalima, Niš, 28. Septembar (2013).
6. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *Electrospray ionization mass spectrometry in the analysis of in vitro formation of chlorophyll complex with copper*, 23rd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, CE01, p.84, 08-11 Oktobar (2014).
7. Jelena Zvezdanović, **Sanja M. Petrović**, Dejan Marković: *The analysis of the chlorophyll complex with zinc by electrospray ionization mass spectrometry*, XI Simpozijum - Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem, p. 116, Tehnološki fakultet Leskovac, 23-24. Oktobar (2015).
8. **Sanja M. Petrović**, Saša Savic, Živomir Petronijevic, Dejan Marković: *Enzymatic degradation of chlorophyll a; Product identification and pH influence*, XI Simpozijum - Savremene tehnologije i privredni razvoj, sa međunarodnim učešćem, p. 64, Tehnološki fakultet Leskovac, 23-24. Oktobar (2015).

Техничка и развојна решења – Нови технолошки поступак (M83=4)

Техничка решења – Нови производ или технологија (R31=4)

1. **Sanja M. Petrović**, Dejan Z. Marković: *Laboratorijski tehnološki postupak za produkciju lipozoma sa inkorporisanim hlorofilom*, ev. br. 06-2178/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 27. Decembar (2012).

2. Jelena B. Zvezdanović, **Sanja M. Petrović**, Dejan Z. Marković: *Laboratorijski tehnološki postupak izolacije hlorofila iz biljnog materijala*, ev. br. 06-2185/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 28. Decembar (2012).
3. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović: *Laboratorijski tehnološki postupak za inkorporaciju izolovanog hlorofilida u liposome*, pp. 1-18, Tehnološki Fakultet Leskovac, ev. br. 06-2365/1, 20. Decembar (2013). DIAPHARM DOO Niš
4. **Sanja M. Petrović**, Dragan J. Cvetković, Sanela Đorđević: *Laboratorijski tehnološki postupak za produkciju lipozoma definisanih veličina postupkom ekstrudiranja*, pp. 1-17, Tehnološki Fakultet Leskovac, ev. br. 06-1153/1, 02. Jun (2014). DIAPHARM DOO Niš.

Tehnička i razvojna rešenja – Nova metoda (M85=2)

Tehnička rešenja –Nova metoda (R33=2)

1. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović, Dejan Z. Marković: *Izolovanje i identifikacija hlorofilida iz spanaća HPLC metodom*, ev. br. 06-2179/1, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, 27. Decembar (2012).
2. Jelena B. Zvezdanović, **Sanja M. Petrović**: *Metoda kompleksiranja hlorofila sa bakrom – identifikacija i stabilnost prema UVB zračenju*, pp.1-13, Tehnološki Fakultet Leskovac, ev. br. 06-2366/1, 20. Decembar (2013). DIAPHARM DOO Niš.
3. **Sanja M. Petrović**, Jelena B. Zvezdanović: *LC-MS metoda za identifikaciju hlorofilina*, pp.1-15, Tehnološki Fakultet Leskovac, ev. br. 06-1156/1, 02. Jun (2014). DIAPHARM DOO Niš.