

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за оцену докторске дисертације **Милице С. Јанков**, магистра фармације

На редовној седници Наставно–научног већа Хемијског факултета одржаној 10. октобра 2024. године изабрани смо у Комисију за оцену докторске дисертације Милице С. Јанков, магистра фармације, под насловом:

**„Фитохемијски профил и биолошка активност листа чуваркуће
(*Sempervivum tectorum* L.)“**

Пошто смо поднели дисертацију прегледали, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидата Милице С. Јанков написана је на српском језику, на 120 страна А4 формата (фонт Times New Roman величине 12 pt, са проредом 1, маргинама 2 cm) и садржи 47 слика, 18 табела и 158 литературних навода. Дисертација се састоји из 7 поглавља: *Увод* (1 страна), *Општи део* (24 стране), *Експериментални део* (11 страна), *Резултати и дискусија* (48 страна), *Закључак* (4 стране), *Литература* (11 страна), *Прилог* (11 страна). Поред тога, дисертација садржи: *Захвалницу* на српском језику, *Изводе* на српском и енглеском језику, *Садржај*, *Биографију кандидаткиње* на српском језику, *Списак објављених радова*, *Изјаву о ауторству*, *Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада* и *Изјаву о коришћењу*. Дисертација је по својој структури и садржају у потпуности у складу са стандардима прописаним од стране Универзитета у Београду.

Увод садржи предмет и циљ истраживања ове докторске дисертације, са посебним нагласком на значај развоја метода за испитивање чуваркуће, биљке која је широко заступљена у традиционалној медицини за третирање различитих стања. Ипак, главни недостатак лежи у чињеници да чуваркућа још увек нема званичну монографију у Европској фармакопеји, нити постоје стандардизоване смернице за њено испитивање и употребу. Додатно, позната је примена свежих листова чуваркуће у комбинацији са медом, међутим, овај фитохемијски састав и биолошка активност оваквог препарата до сада нису испитивани. У Уводу је истакнут значај научног циља ове дисертације а то је систематска фитохемијска карактеризација и *in vitro* одређивање биолошке активности, укључујући антиоксидативно, антидијабетско и антибактеријско дејство, како за листове чуваркуће тако и за препарат припремљен од свежих листова чуваркуће и меда. Такође, истакнут је значај резултата ове докторске дисертације уз напомену да ова истраживања пружају свеобухватни увид у фитохемијски састав и биолошку активност листова чуваркуће и препарата чуваркуће и меда, што би могло допринети бољој евалуацији и ширем прихватању чуваркуће у медицини и фармацији.

Општи део је подељен у осам тематских целина. У првој целини, **Традиционална примена лековитих биљака**, истакнута је дуга историја и значај коришћења лековитих биљака у традиционалној медицини широм света, као и њихова све већа интеграција у савремену медицину захваљујући бројним истраживањима која потврђују њихова лековита својства. Такође, споменуте су кључне фармакопеје и прописи који регулишу употребу биљних лекова и традиционалних биљних лекова у Србији, као и стандарди који се морају испунити у погледу квалитета, ефикасности и безбедности ових препарата. У другој и трећој целини, **Секундарни метаболити биљака** и **Биолошка активност секундарних метаболита**, описани су различити типови секундарних метаболита, као што су терпенска и фенолна једињења и алкалоиди, који играју значајну улогу у адаптацији биљака на околину и у њиховој заштити од патогена и других фактора стреса. Поред овога, описане су и врсте биолошке активности које испољавају наведена једињења, укључујући антиоксидативну, антимикробну, антиинфламаторну, антидијабетску и друге, што их чини изузетно важним за примену у медицини и фармацији. У четвртој целини, **Чуваркућа (*Sempervivum tectorum* L.)**, наведени су таксономска класификација и морфолошке карактеристике ове биљке. Истакнута је и њена традиционална примена у народној медицини различитих земаља, посебно за третман упала, кожних обољења и поремећаја варења. Приказан је преглед фитохемијског састава чуваркуће, који обухвата органске киселине, фенолна једињења и шећере, добијен на основу досадашњих испитивања. На крају су наведена истраживања која потврђују биолошку активност чуваркуће, укључујући њена антиоксидативна, антимикробна, хепатопротективна и антиканцерогена својства, као и њену примену у лечењу рана. У петој целини, **Мед**, описан је овај природни производ медоносних пчела и дата је његова класификација према пореклу. Дат је приказ главних састојака меда која доприносе његовим бројним терапеутским својствима. Мед се такође карактерише као природна еутектичка смеша са способношћу растварања поларних и неполарних једињења, што га чини корисним у припреми различитих препарата. Мед са додацима има широку примену у традиционалној медицини, али је релативно мало студија које описују њихове терапеутске ефекте. Истраживања указују на потенцијал ових препарата у лечењу различитих здравствених стања, укључујући инфекције, ране, астму, дијабетес и анемију, док истовремено истичу потребу за даљим научним испитивањима ради процене њихове ефикасности. У шестој целини, **Методе за испитивање фитохемијског профила**, детаљно су описане карактеристике и основни принципи метода које су коришћене за анализу фитохемијског профила осушених листова чуваркуће и препарата од свежих листова чуваркуће и меда. Седма целина, **Методе за одређивање биолошке активности**, даје преглед метода примењених у дисертацији за одређивање биолошке активности узорака. Овде су описани основни принципи спектрофотометрије, директне биоаутографије и агар–дифузионе методе у бунарићима. Поред тога, објашњен је поступак обраде дигиталних слика хроматограма, као и примена теорије функционала густине (DFT) за процену антиоксидативне активности одабраних једињења. У оквиру осме целине, **Анализа главних компонената**, дат је кратак опис ове мултиваријантне методе (РСА) која је коришћена за визуализацију груписања узорака (објеката) на основу сличности и разлика у односу на експериментално добијене резултате.

У оквиру поглавља **Експериментални део** наведени су подаци о узорцима чуваркуће као и детаљан начин припреме препарата свежих листова чуваркуће и меда. Поред тога, наведени су материјали, реагенси и хемикалије који су коришћени током реализације експеримената, као и опис експерименталних процедура коришћених у оквиру докторске дисертације.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата две целине у којима су представљени резултати испитивања осушених листова чуваркуће и препарата свежих листова чуваркуће са багremовим и ливадским медом. Прва целина, под називом **Фитохемијска**

карактеризација, подељена је у седам подцелина: а) Садржај влаге у узорцима листова чуваркуће, б) Спектрофотометријско одређивање укупног садржаја фенола, в) Идентификација фенолних једињења, г) Квантификација фенолних једињења, д) НРТLC фенолни профил, њ) Профил шећера и е) Елементална анализа. Ове подцелине детаљно разматрају фитохемијски профил узорака, пружајући увид у њихов састав и биоактивне компоненте. Најпре је описан процес сушења листова чуваркуће и одређен је садржај влаге. Укупан садржај фенола у екстрактима осушених листова чуваркуће, свежих листова чуваркуће, чистог меда и препарата чуваркуће са медом одређен је Фолин-Чикалтеу спектрофотометријским тестом. Примењена је ултраефикасна течна хроматографија са масеним детектором високе резолуције (UPLC–LTQ OrbiTrap MS) ради идентификације фенолних једињења у екстрактима осушених листова чуваркуће. Затим је, на основу унапред дефинисаних стандарда, извршена квантификација фенолних једињења у истим екстрактима применом ултраефикасне течне хроматографије спрегнуте са ултравиолетним детектором са низом диода и масеним детектором (UPLC–DAD MS/MS). Посебно је значајно што је у оквиру ове дисертације први пут развијен фенолни профил екстраката осушених листова чуваркуће и препарата чуваркуће са медом, коришћењем високоефикасне танкослојне хроматографије (НРТLC). Профил шећера у узорцима утврђен је применом високоефикасне анјонско–измењивачке хроматографије са пулсном амперометријском детекцијом (НРАЕС–РАD), док је садржај макро– и микроелемената одређен коришћењем индуктивно спрегнуте плазме са оптичком емисионом спектроскопијом (ICP–OES). Друга целина под насловом **Биолошка активност** обухвата три подцелине: а) Антиоксидативна активност, б) Антидијабетска активност и в) Антибактеријска активност. Антиоксидативна активност је испитана спектрофотометријски и НРТLC методом у екстрактима осушених листова чуваркуће као и у екстрактима препарата чуваркуће са медом. Спектрофотометријски тестови, као што су тест укупне редукционе моћи (TRP) и тест укупног антиоксидативног капацитета–фосфомолибденска метода (TAC) први пут су коришћени у оквиру ове дисертације за одређивање антиоксидативне активности екстраката чуваркуће. Такође, ова два теста су по први пут оптимизована и развијена НРТLC методом. Да би се стекао увид у механизме антиоксидативне активности изабраних фенолних једињења која су идентификована НРТLC методом у екстрактима осушених листова чуваркуће коришћена је теорија функционала густине (DFT). Први пут је, у оквиру ове дисертације, испитана антидијабетска активност чуваркуће при чему су коришћени спектрофотометријски α –амилаза тест и НРТLC–амилаза тест. Антибактеријска активност је испитана агар–дифузионим методом у бунарићима, као и НРТLC–антибактеријским тестовима. Метода НРТLC–директне биоаутографије први пут је оптимизована и примењена у оквиру ове дисертације за развијање антиоксидативних, антидијабетских и антибактеријских профила екстраката чуваркуће и екстраката препарата чуваркуће са медом.

У поглављу **Закључак** сумирани су и прокоментарисани резултати добијени у оквиру докторске дисертације.

Наведена **Литература** (158 цитата) обухвата радове/књиге из области истраживања и покрива све делове дисертације.

У **Прилогу** су дати неки од експерименталних података који су добијени у оквиру истраживања описаних у поглављу Резултати и дискусија.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

Фенолна једињења присутна у листовима чуваркуће доприносе испољавању биолошке активности ове биљке, што објашњава њену широку употребу у традиционалној медицини. Ова дисертација пружа прву свеобухватну, систематску фитохемијску карактеризацију

листова чуваркуће (*Sempervivum tectorum* L.), као и препарата од свежих листова чуваркуће у комбинацији са багремовим и ливадским медом, уз истовремену процену њихове биолошке активности. Коришћењем напредних аналитичких техника, као што су UPLC–LTQ OrbiTrap MS и UPLC–DAD MS/MS, идентификована су и квантификована фенолна једињења у екстрактима осушених листова чуваркуће. Спектрофотометријски одређен укупан садржај фенола (TPC) показао је да екстракти осушених листова чуваркуће имају већи садржај фенолних једињења у односу на екстракте свежих листова. Утврђено је да је комбинација чуваркуће са медом довела до повећања TPC у поређењу са чистим медом, при чему су вредности остале стабилне током пет недеља, што указује на стабилност и могућност дуготрајне употребе ових препарата. HPTLC метода је по први пут оптимизована за профилисање фенолних једињења и процену биолошке активности екстраката осушених листова чуваркуће и њених препарата са медом. Ова метода је омогућила прецизну идентификацију главних биоактивних једињења попут галне киселине, изокверцетина, кофеинске киселине, кемферола и астрагалина. Примењена обрада хроматограма, заједно са PCA, омогућила је препознавање једињења која су одговорна за специфично груписање екстраката. У оквиру овог истраживања, први пут је одређен комплетан профил шећера у узорцима осушених и свежих листова чуваркуће, меда и њихових препарата, применом HPAEC–PAD технике. У осушеним листовима доминирају глукоза и фруктоза, док су у свежим листовима најзаступљенији шећери фруктоза, сахароза и изомалтоза. Нижи садржај глукозе и фруктозе у свежим листовима у односу на осушене је од посебне важности, с обзиром на традиционалну употребу свеже чуваркуће за смањење нивоа шећера у крви. Додавање свежих листова чуваркуће у мед довело је до смањења укупног садржаја шећера у препаратима. Применом ICP–OES методе квантификовани су макро– и микроелементи у осушеним листовима чуваркуће, при чему је утврђено да су најзаступљенији калцијум, магнезијум и калијум, док су по први пут одређене концентрације фосфора и сумпора. Садржај токсичних елемената, као што су кадмијум и никл, били су испод прописаних граничних вредности. У оквиру истраживања биолошке активности, екстракти чуваркуће показали су антиоксидативни потенцијал, испитан спектрофотометријским тестовима и HPTLC методом. Тестови укупне редукционе моћи (TRP) и укупног антиоксидативног капацитета (TAC) први пут су примењени и оптимизовани HPTLC методом. Поред тога, антидијабетска активност екстраката листова чуваркуће и њених препарата са медом је по први пут испитивана употребом α -амилаза спектрофотометријског теста и HPTLC–амилаза теста, чиме је омогућена идентификација једињења која доприносе овој активности. Антибактеријска активност екстраката осушених листова чуваркуће и препарата са медом доказана је употребом агар–дифузионе методе и HPTLC–директне биоаутографије. Добијени биоаутограми указују на то да различита једињења присутна у екстрактима доприносе испољавању специфичне биолошке активности. Различита једињења су идентификована као главни носиоци антиоксидативне, антибактеријске и антидијабетске активности екстраката. Њихово раздвајање и визуелизација путем HPTLC биоаутограма омогућили су детаљнију процену њиховог индивидуалног доприноса биолошким својствима екстраката, што додатно наглашава њихов потенцијал за даљу примену у терапеутске сврхе. Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације истакли су значајан фитохемијски и биолошки потенцијал чуваркуће и њених препарата са медом, наглашавајући могућности за даље истраживање и њихову могућу примену у медицини и фармацији.

В. Компаративна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Компаративна анализа резултата добијених у оквиру ове дисертације у односу на податке из литературе пружа значајна нова сазнања у области фитохемијске карактеризације и биолошке активности већег броја узорака листова чуваркуће (*Sempervivum tectorum*) и одговарајућих препарата с медом. Чуваркућа је одавно позната у традиционалној

медицини, а њени препарати с медом представљају јединствену комбинацију два природна производа, оба позната по бројним биолошким дејствима. Досадашња истраживања углавном су обухватала анализу једног збирног узорка листова или сока исцеђеног из листова чуваркуће. Пре свега је, у оквиру ове дисертације, одређен садржај воде у листовима чуваркуће, податак који је до сада био наведен само у оквиру једног истраживања. Док је у претходним истраживањима идентификован мањи број фенолних једињења, у оквиру ове дисертације у екстрактима чуваркуће идентификовано је укупно 38 једињења од којих 21 једињење први пут. Квантификовано је укупно 19 једињења на основу примене одговарајућих стандарда. Осим тога, први пут је оптимизована и примењена НРТLC метода за анализу фенолног профила како екстраката чуваркуће, тако и препарата с медом. Одређивање профила шећера представља још један значајан допринос ове дисертације. Према литературним подацима до сада нема детаљних истраживања о профилима шећера у листовима чуваркуће. У оквиру ове студије први пут је одређен профил шећера у свежим и осушеним листовима, као и у одговарајућим препаратима чуваркуће са медом. Примењена је анализа главних компонената како би се боље сагледале сличности и разлике међу узорцима на основу физичкохемијских карактеристика. Иако је биолошка активност листова и сока чуваркуће раније испитивана, посебно у погледу антиоксидативних, антимикробних и антиноцицептивних својстава, антидијабетска активност листова чуваркуће до сада није била предмет истраживања. Поред тога, у досадашњој литератури нису били доступни подаци о биолошкој активности одговарајућих препарата чуваркуће са медом. Ово истраживање тиме значајно доприноси проширењу научних сазнања о саставу и карактеристикама комбинованих препаратима чуваркуће и меда. У литератури су раније коришћени спектрофотометријски тестови попут DPPH, ABTS и FRAP за испитивање антиоксидативне активности, док су у овом истраживању по први пут примењени и TRP и TAC тестови, који су омогућили детаљнију и прецизнију анализу. Антидијабетска активност екстраката листова чуваркуће је по први пут одређена спектрофотометријским α -амилаза тестом, док се у литератури већ наводе подаци о антибактеријској активности добијеној микродилуционим тестом. У оквиру ове дисертације, по први пут је примењена и НРТLC директна биоаутографија у комбинацији са дигиталном обрадом слике хроматограма и анализом главних компонената за процену антиоксидативне, антидијабетске и антибактеријске активности, што је пружило увид у појединачна једињења одговорна за испољавање одговарајуће биолошке активности. Осим тога, НРТLC–TRP и НРТLC–TAC тестови први пут су развијени и оптимизовани у оквиру ове дисертације за одређивање антиоксидативне активности. Добијени резултати пружају значајна нова сазнања о фитохемијском саставу и биолошкој активности листова чуваркуће и одговарајућих препарата са медом, који до сада нису били доступни у литератури, и отварају могућности за будућа истраживања и примену у фармацији и медицини.

Г. Научни радови објављени у међународним часописима и саопштења са скупова који су део докторске дисертације

Резултати испитивања у оквиру ове докторске дисертације до сада су објављени у оквиру два научна рада. Један рад штампан је у врхунском међународном часопису (M21), а један рад у међународном часопису (M23). Такође, резултати су презентовани у облику пет саопштења на научним скуповима међународног и националног значаја штампаних у изводу.

Рад објављен у врхунском међународном часопису (M21)

1. **Milica Jankov**, Petar Ristivojević, Ilija Cvijetić, Dušanka Milojković-Opsenica. Assessing radical scavenging capacity of *Sempervivum tectorum* L. leaf extracts: An integrated high-performance thin-layer chromatography/*in silico*/chemometrics approach. *Journal of Chromatography A* (2023), 1703, 464082. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464082>

Рад објављен у међународном часопису М(23)

1. **Milica S. Jankov**, Dušanka M. Milojković Opsenica, Jelena Đ. Trifković, Pedja T. Janačković, Petar M. Ristivojević, Antibacterial profiling of *Sempervivum tectorum* L. (common houseleek) leaves extracts using high-performance thin-layer chromatography coupled with chemometrics, *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* (2023), <https://doi.org/10.1007/s00764-023-00269-6>

Саопштења на међународним научним скуповима штампана у изводу (М34)

1. **Milica Jankov**, Ilija Cvijetić, Dušanka Milojković-Opsenica: “DFT study of the antioxidant activity of polyhydroxyflavones identified in houseleek leaf extracts” 1st European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, Belgrade, Serbia, September 7-9, 2022, 1-EuSPMF Book of Abstracts, p. 59, ISBN 978-86-7834-408-4
2. **Milica S. Jankov**, Petar M. Ristivojević, Aleksandra D. Radoičić, Nikola M. Horvacki, Dušanka M. Milojković Opsenica: Assessment of the antioxidant and antidiabetic activity of the extracts of houseleek leaves and honey mixture based on the phytochemical profile, The 3rd International UNIFood Conference, 28-29 Jun 2024, Belgrade, Serbia, Book of abstracts, p. 72, ISBN 978-86-7834-438-1

Саопштења на националним научним скуповима штампана у изводу (М64)

1. **Milica S. Jankov**, Petar M. Ristivojevic, Jelena Đ. Trifkovic, Ilija N. Cvijetic, Dušanka M. Milojkovic Opsenica: “Spectrophotometric determination of total phenolic content and antioxidant capacity of houseleek leaf extracts (*Sempervivum tectorum* L.) and phenolic profile” 58th Meeting of the Serbian Chemical Society, Book of Abstracts, Proceedings, Belgrade, Serbia, June 9-10, 2022, ISBN 978-86-7132-079-5
2. **Milica S. Jankov**, Petar M. Ristivojević, Dušanka M. Milojković-Opsenica: “Four radical scavenging activity-HPTLC assays in combination with chemometrics for the assessment of antioxidant activity of *Sempervivum tectorum* L. leaf extracts” 8th Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, 29th October 2022; Book of Abstracts, ISBN 978-86-7132-080-1
3. **Milica S. Jankov**, Dušanka M. Milojković Opsenica, Petar M. Ristivojević: Assessment of antibacterial activity of *Sempervivum tectorum* L. leaves extracts using HPTLC bioassays and chemometrics, 9th Conference of Young Chemists of Serbia, 4th November 2023, Belgrade, Serbia, Book of abstracts PFC PP 25, p. 142, ISBN 978-86-7132-084-9

Д. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018). Помоћу програма iThenticate, утврђено је да количина подударана текста износи 19% и то за три од 337 извора појединачно износи 1%, а за остале је мањи од 1%. Подударност од 1% утврђена је са радом кандидаткиње проистеклим из тезе (**M. Jankov et al.** *Journal of Chromatography A* (2023), 1703, 464082) и докторским дисертацијама Александре Драмићанин (Фитохемијски профил кртола као показатељ порекла и начина производње кромпира, Универзитет у Београду – Хемијски факултет, 2022) и Биљане Тубић (Derivati etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil) propanske kiseline sa potencijalnim citotoksičnim dejstvom - in silico/in vitro fizičko-hemijska i ADME karakterizacija, Фармацеутски факултет Универзитета у Београду, 2018).

Утврђене подударности могу се описати као: последица цитата, личних имена, афилијација, назива једињења и скраћеница, назива коришћених материјала и метода и њиховог начина извођења, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података.

На основу свега изложеног Комисија сматра да је докторска дисертација Милице С. Јанков оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Е. ЗАКЉУЧАК

На основу свега изложеног може се закључити да је у поднетој дисертацији под насловом „**Фитохемијски профил и биолошка активност листа чуваркуће (*Sempervivum tectorum* L.)**“ кандидаткиња, магистар фармације Милица С. Јанков, успешно одговорила на све постављене задатке који се односе на детаљну фитохемијску карактеризацију и одређивање биолошке активности листова чуваркуће и одговарајућих препарата чуваркуће са медом. Комисија сматра да резултати објављени у оквиру ове докторске дисертације представљају значајан и оригиналан научни допринос развоју и оптимизацији аналитичких поступака у циљу успостављања стандардних процедура за испитивање чуваркуће, чиме би се допринело њеној бољој евалуацији и званичној примени у фармацији и медицини.

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у оквиру два научна рада, од чега један рад у врхунском међународном часопису (М21) и један рад у међународном часопису (М23), као и пет саопштења штампаних у изводу, од чега два на скуповима међународног значаја (М34) и три на скуповима националног значаја (М64).

На основу свега изложеног Комисија сматра да се ова дисертација уклапа у савремене трендове аналитичке хемије, те на основу свега изложеног предлаже Наставно–научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да прихвати поднету докторску дисертацију Милице С. Јанков под насловом „**Фитохемијски профил и биолошка активност листа чуваркуће (*Sempervivum tectorum* L.)**“ и одобри њену одбрану.

У Београду, 8. 11. 2024.

Комисија:

Др Јелена Трифковић, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Др Петар Ристивојевић, доцент
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Др Вукосава Живковић–Радовановић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Др Пеђа Јанаћковић, редовни професор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет