

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. Статута Универзитета у Београду (“Гласник Универзитета” број 131/06),
дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата

Мр БРАНИСЛАВА (Јован) НАСТАСИЈЕВИЋА, дипл. инж.
(име, име једног од родитеља и презиме)

КАНДИДАТ: **Мр БРАНИСЛАВ (Јован) НАСТАСИЈЕВИЋ, дипл. инж.**

пријавио је докторску дисертацију под називом:

**„Биолошки ефекти екстраката корена линцуре (*Gentiana lutea*)-инхибиција ензима,
антиоксидативна и антимикробна активност“**

Из научне области: **ХЕМИЈА И ХЕМИЈСКА ТЕХНОЛОГИЈА**

Универзитет је дана **19.11.2012.** године, својим актом **02 број: 06-21043/17-12,** дао сагласност
на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

**„Биолошки ефекти екстраката корена линцуре (*Gentiana lutea*)-инхибиција ензима,
антиоксидативна и антимикробна активност“**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Мр БРАНИСЛАВА (Јован) НАСТАСИЈЕВИЋА, дипл. инж.
(име, име једног од родитеља и презиме)

образована је на седници одржаној **14.04.2016.** године Одлуком Факултета под бр. **35/172,** у
саставу:

Име и презиме	Звање	Научна област
1. Др Сузана Димитријевић-Бранковић	Ванредни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
2. Др Весна Васић	Научни саветник	Биофизичка хемија
3. Др Душан Антоновић	Редовни професор	Инжењерство заштите животне средине

Наставно-научно веће Факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске
дисертације на седници одржаној дана **23.06.2016.** године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаковић

На основу чл. 128. Закона о високом образовању и чл. 129. Статута ТМФ-а, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 23.06.2016. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: др Сузана Димитријевић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Весна Васић, научни саветник Универзитета у Београду, Институт за нуклеарне науке „Винча“, др Душан Антоновић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: „**Биолошки ефекти екстракта корена линцуре (*Gentiana lutea*)- инхибиција ензима, антиоксидативна и антимикробна активност**“ коју је поднео **мр БРАНИСЛАВ НАСТАСИЈЕВИЋ** и упућује се на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације Бранислава Настасијевића под називом „Биолошки ефекти екстракта корена линцуре (*Gentiana lutea*)- инхибиција ензима, антиоксидативна и антимикробна активност“ Одлуком 02 број: 06-21043/17-12 од 19.11.2012. године.

Верификација научних доприноса:

Kategorija M21

1. B. Nastasijević, T. Lazarević-Pašti, S. Dimitrijević-Branković, I. Pašti, A. Vujačić, G. Joksić, V. Vasić, Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2012) 66:191– 196. (IF (2011)=**2,967**) (ISSN 0731-7085).

Kategorija M23

1. B. Nastasijević, M. Milosević, G. Janjić, V. Stanić, V. Vasić, *Gentiana lutea* extracts and their constituents as inhibitors of synaptosomal Ecto-NTPDase, International Journal of Pharmacology (2016) 12 (4):272-289. (IF (2014)=**0,709**) (ISSN 1811-7775).
2. C. Akileshwari, P. Muthenna, B. Nastasijević, G. Joksić, J.K. Petrash, G.B. Reddy, Inhibition of Aldose Reductase by *Gentiana lutea* Extracts, Exp Diabetes Res., 2012 (2012) 147965, doi:10.1155/2012/147965 (IF(2011)=**1,2**) (ISSN 1687-5214).

Докторска дисертација и Реферат о оцени докторске дисертације достављају се на увид јавности, а по истеку рока од 30 дана, на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Одлуку доставити: Већу научних области техничких наука Универзитета, докторанду, ментору, Служби за наставно-студентске послове, Библиотеци и Архиви факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

UNIVERZITET U BEOGRADU

TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

Predmet: referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata mr Branislava Nastasijevića, dipl. biohemičara. Odlukom Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta br. 35/172 od 14.04.2016. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata mr Branislava J. Nastasijevića pod naslovom: „Biološki efekti ekstrakata korena lincure (*Gentiana lutea*)- inhibicija enzima, antioksidativna i antimikrobna aktivnost.“ Posle pregleda dostavljene disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa kandidatom Komisija je sačinila sledeći

REFERAT

1.UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

- 21.06.2012. Nastavno-naučno veće Tehnološkog fakulteta je donelo odluku o imenovanju komisije za ocenu podobnosti teme.
- 7.11.2012. Nastavno -naučno veće Tehnološkog fakulteta je donelo odluku br. 35/386 o prihvatanju Referata komisije za ocenu podobnosti teme kandidata za izradu doktorske disertacije pod nazivom: „ Biološki efekti ekstrakata korena lincure (*Gentiana lutea*)-inhibicija enzima, antioksidativna i antimikrobna aktivnost.“ Za mentore doktorske disertacije imenovani su dr Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta i dr Vesna Vasić, naučni savetnik, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.
- 19.11.2012. Veće naučnih oblasti tehničkih nauka dalo je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije Branislava Nastasijevića pod nazivom: „Biološki efekti ekstrakata korena lincure (*Gentiana lutea*)-inhibicija enzima, antioksidativna i antimikrobna aktivnost.“
- 14.04.2016. Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta je donelo odluku o imenovanju komisije za ocenu i odbranu doktorske teze kandidata mr Branislava Nastasijevića.

1.2. Mesto disertacije u odgovarajućoj naučnoj oblasti

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Hemija i hemijska tehnologija za koju je matičan Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu. Na osnovu objavljenih radova u navednoj naučnoj oblasti i dosadašnjeg iskustva u naučno

istraživačkom radu, konstatujemo da su imenovani članovi Komisije, kompetentni za ocenu i odbranu doktorske disertacije.

1.3. Biografski podaci o kandidatu

Branislav Nastasijević rođen je 25.05.1972. godine u Beogradu. Diplomirao je na Hemijskom fakultetu u Beogradu, smer biohemija, 01.03.2000. godine sa prosečnom ocenom 8,64 čime je stekao stručno zvanje diplomirani biohemičar. Magistrirao je na Hemijskom fakultetu u Beogradu, smer biohemija, 21.07.2009. godine sa temom: “Mogućnost primene magnetnih zrnaca sa jonima nikla helatno vezanim za trinitrilosirćetnu kiselinu u izolovanju iRNK” čime je stekao stručno zvanje magistar biohemijskih nauka.

Od marta 2000. godine do oktobra 2005. angažovan je kao asistent, na Katedri za biohemiju, Hemijskog fakulteta u Beogradu, u grupi profesora Miroslava M. Vrvica na predmetima: Mikrobiološka hemija sa mikrobiologijom, Osnovi Biotehnologije, Biohemija hrane i ishrane i Biotehnološka i industrijska biohemija. U periodu od oktobra 2005. do decembra 2006. radio je kao istraživač saradnik na Odseku za biohemiju i molekularnu biologiju, klinike Mayo (SAD), u grupi profesora James L. Mahera. Od jula 2007. do januara 2010. bio je zaposlen u Industriji špirita i kvasca „A.D. Vrenje”, kao rukovodilac laboratorije.

Od 12.01.2010. pa do sada zaposlen je kao istraživač saradnik u INN „Vinča” u laboratoriji za Fizičku hemiju. Angažovan je na projektu 172023 pod nazivom: „Istraživanje interakcija enzima sa toksičnim i farmakološki aktivnim molekulima”, čiji je rukovodilac naučni savetnik dr Vesna Vasić. U periodu od 2010-2014. bio je angažovan i na međunarodnom FP7 projektu FUNCFOOD, broj granta 245030.

Branislav Nastasijević je autor ili koautor 13 radova koji su objavljeni u časopisima međunarodnog (7 M₂₁, 3 M₂₂, 3 M₂₃) značaja iz oblasti hemije, biohemije i molekularne biologije kao i više publikacija na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija mr Branislava Nastasijevića, dipl. biohemičara pod nazivom: „Biološki efekti ekstrakata korena lincure (*Gentiana lutea*)- inhibicija enzima, antioksidativna i antimikrobna aktivnost“ sadrži 170 strana teksta sa 59 slika, 25 tabela i čine je: Uvod (3 strane), Pregled literature (42 strane), Materijal i metode (15 strana), Rezultati i diskusija (75 strana), Zaključci (3 strane), Literatura (20 strana sa 196 literaturnih navoda) i Prilozi (12 strana, 9 priloga sa 9 slika i 2 tabele). Pored navedenog disertacija sadrži Rezime na srpskom i engleskom jeziku, Listu skraćenica, Sadržaj, Zahvalnicu i Biografiju autora. Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde za doktorsku disertaciju.

2.2. Kratak opis pojedinih poglavlja

U **Uvodu** kandidat navodi značaj prirodnih proizvoda, posebno biljnih ekstrakta kao izvora farmakološki aktivnih jedinjenja. Po podacima svetske zdravstvene organizacije smatra se da je oko 11% lekova biljnog porekla. Takođe značajan broj je dobijen modifikacijom prirodnih prekursora, izolovanih iz biljaka. Kada je reč o antitumorskim ili antimikrobnim lekovima čak 60% je prirodnog porekla. *G. lutea* ili žuta lincura je biljka koja je u širokoj upotrebi u narodnoj medicini i čija je upotreba opisana u većini svetskih farmakopeja. Cilj rada doktorske disertacije je bio ispitivanje bioloških efekata ekstrakata dobijenih iz korena ove biljke. Ispitivan je uticaj ekstrakta i pojedinih konsitituenata karakterističnih za ovu biljku na sledeće enzime: mijeloperoksidazu (MPO), acetilholinesterazu (AChE) i ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaza (E-NTPDaza). Takođe ispitivano je njihovo antioksidativno i antimikrobno delovanje. Pošto su ekstrakti pokazali određen stepen antioksidativne i antimikrobne aktivnosti dodatno su ispitani i njihovi radiobiološki efekti.

Pregled literature (opšti deo) prikazan je u osam potpoglavlja. U prvom potpoglavlju je opisana klasifikacija familije *Gentianaceae* i mesto roda *Gentiana* u njoj. U drugom potpoglavlju dat je prikaz farmakoloških svojstava korena lincure, u trećem kvalitativni sastav gde su navedeni glavni konstituenti ove biljke kao i njihova hemijska struktura. U četvrtom potpoglavlju opisani su do sada poznati biološki efekti glavnih klasa jedinjenja prisutnih u korenu lincure. U petom potpoglavlju je opisan značaj ispitivanja prirodnih jedinjenja kao inhibitora enzima i dat je pregled glavnih karakteristika enzima (MPO, AChE i E-NTPDaza) koji su ispitivani u ovoj disertaciji. U šestom potpoglavlju opisana je antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakta a u sedmom radioprotektivna i antiproliferativna aktivnost prirodnih jedinjenja. U osmom potpoglavlju je opisana antimikrobna aktivnost sa posebnim osvrtom na postojeća saznanja o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakta lincure.

U poglavlju **Materijal i metode**, koga čine sedam potpoglavlja navedeni su: korišćeni instrumenti i hemikalije, priprema ekstrakata, kvalitativna i kuantitativna analiza u kojem su dati uslovi hromatografskog razdvajanja na UPLC, HPLC, TQD, ESI/TOF i MALDI TOFu. U petom potpoglavlju opisan je postupak za ispitivanje inhibicije enzima: MPO, AChE i E-NTPDaza, kao i *docking* studije. U šestom potpoglavlju je opisana antioksidativna i antimikrobna aktivnost. Navedeni su uslovi za izođenje DPPH testa i ciklične voltametrije (CV) kao i podloge i vrste mikroorganizama koje su korišćene (*Fusarium* i *Aspergillus*) za ispitivanje antimikrobne aktivnosti. U poslednjem, sedmom potpoglavlju je opisano određivanje radioprotektivnih efekata, koji obuhvataju određivanje mikronukleusa (MN), indeksa proliferacije (IP) i ćelija u apoptozi.

U delu **Rezultati i diskusija** prikazani su rezultati dobijeni u eksperimentalnom delu ove disertacije, njihova analiza i diskusija koja uključuje poređenje sa literaturnim podacima. Na samom početku opisana je kvalitativna analiza ekstrakta korena lincure pomoću sledećih tehnika: UPLC-PDA, MALDI-TOF i HPLC-MS/ESI-TOF. Opisani su uslovi hromatografskog razdvajanja i prikazana su identifikovana jedinjenja dobijena MALDI-TOF masenom spektrometrijom i HPLC-MS/ESI-TOF. Zatim je izvršena kvantitativna analiza ekstrakta kojom je određen sadržaj sedam odabranih konsituenata: loganske kiseline, svertiamarina, genciopikrozida, sverozida, izoviteksina, amarogentina i izogentizina. Sadržaj navedenih

komponenti je određen pomoću UPLC/PDA-TQD, u MRM modu. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim u kojima je takođe utvrđeno da je najzastupljeniji konsituent genciopikrozid. Razlika u kvantitativnom sadržaju pojedinih ekstrakta potiče od razlike u polarnosti rastvarača koji se korsiti za ekstrakciju, što se odražava posebno na sadržaj nepolarnijih komponenti, u ovom slučaju izogentizina.

U sledećem delu ispitivan je uticaj ekstrakta i navedenih konstituenata na aktivnost enzima MPO, AChE i E-NTPDaze (izolovan iz sinaptozoma pacova). Etanolno-vodeni ekstrakti a posebno 50% EtOH (v/v u vodi) su se pokazali kao potentni inhibitori navedenih enzima u količinama od 100 do 200 µg/mL. U grupi ispitivanih konsitituenata, najefikasniji inhibitori su identifikovani u grupi sekoiridoida (genciopikrozid i amarogentin). Pored *in vitro* testiranja pojedni konstituenti su analizirani i *docking* studijom kojom su određene energije vezivanja za E-NTPDazu2.

Zatim je ispitivan antioksidativni potencijal ovih ekstrakta pri čemu je najviši antioksidativni kapacitet pokazao 50% EtOH ekstrakt, sa najnižim IC₅₀ i anodnim pikom dobijenim CV, sa najvećim ukupnim naelektrisanjem u odnosu na ostale ekstrakte. U ekstraktima je određivan i sadržaj ukupnih polifenola pri čemu je utvrđena povezanosti između njihovog sadržaja i antioksidativne aktivnosti.

Analizom radioprotektivne aktivnosti je pokazano da kiseli ekstrakt lincure pokazuje najbolja radioprotektivna svojstva jer indukuje u najmanjoj meri učestalost mikronukleusa u kulturi humanih limfocita, pre i nakon γ-zračenja. Od konstituenata najjaču radioprotektivnu aktivnost je pokazao amarogentin a najjaču antiproliferativnu genciopikrozid.

Antimikrobna aktivnost je testirana na fitopatogenima iz rodova *Fusarium* i *Aspergillus*. Odabrane su vrste koje su uzročnici najčešćih bolesti kukuruza i pšenice. Etanolno-vodeni kestrakti a posebno 50 i 96 % (v/v) su pokazali značajnu antifungalnu aktivnost u koncentraciji od 0,5 mg/mL.

U poglavlju **Zaključci** sumirani su najznačajniji rezultati dobijeni u ovom istraživanju uz kratak osvrt o njihovom značaju u pogledu potencijalne primene.

U poglavlju **Literatura** navedene su sve reference citirane u doktorskoj disertaciji.

3. Ocena disertacije

3.1. Savremenost, originalnost i značaj

U poslednjim godinama sve je veći broj naučnih radova koji za temu imaju ispitivanje biološke aktivnosti prirodnih proizvoda i mogućnosti njihove primene kao inhibitora enzima, zatim jedinjenja sa antiproliferativnim (antitumorskim) i antimikrobnim delovanjem. Značajan broj lekova koji se koristi u terapiji ispoljava svoje delovanje putem inhibicije enzima. Kao primer mogu se navesti inhibitori ciklooksigenaza, zatim 5'-α-reduktaza, angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE) i AChE. Najpoznatiji primer prirodnog proizvoda salicin (2-hidroksibenzoeva kiselina) izolovan je iz kore vrbe i predstavlja protivupalni lek koji deluje kao inhibitor enzima ciklooksigenaze. Inhibitori AChE se koriste kao jedini lekovi u terapiji

Alchajmerove bolesti a inhibitori ACE kao regulatori krvnog pritiska. Iz navedenih razloga postoji stalna potreba za odabirom i selekcijom novih inhibitora enzima. Odabir i selekcija novih antimikrobnih jedinjenja postaje sve aktuelnija zbog pojave rezistentnosti na preparate koji se trenutno nalaze u upotrebi. Inhibitori enzima MPO i E-NTPDaze još uvek nemaju terapeutsku primenu jer se njihova uloga i efekti još uvek proučavaju.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U okviru doktorske disertacije citirano je 196 literaturnih navoda, koji su omogućili da se prikaže aktuelnost i trenutno stanje u ispitivanoj oblasti. Najveći broj citiranih radova čine radovi iz međunarodnih časopisa sa tematikom značajnom za izradu doktorske disertacije.

3.3. Opis primenjenih naučnih metoda

Svi rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji dobijeni su primenom savremenih analitičkih instrumenata i metoda, prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature.

Za ispitivanje bioloških efekata lincure pripremljeni su vodeni, kiseli, etanolno vodeni ekstrakti (25-96% etanola u vodi, v/v) metanolni i etarski ekstrakti. Kvalitativna analiza je urađena na MADLI-TOFu, nakon hromatografskog razdvajanja ekstrakata UPLC/PDA hromatografijom i HPLC-MS/ESI-TOF spektrometrijom. Ekstrakti su takođe ispitivani MALDI-TOFom bez prethodnog hromatografskog razdvajanja. Kvantifikacija je izvršena pomoću UPLC-TQDa, u ESI pozitivnom i negativnom polaritetu u MRM modu, sa prelazima karakterističnim za svako od ispitivanih jedinjenja.

Peroksidazna aktivnost mijeloperoksidaza (MPO) u prisustvu ekstrakata lincure i njenih konstituenata, kao inhibitora je određivana spektrofotometrijskom metodom, pomoću o-dianizidin esej. Merena je promene apsorbanije na $\lambda=460\text{nm}$, u toku jednog minuta uz dodatak vodonik peroksida. Aktivnost AChE u prisustvu pomenutih inhibitora ispitivana je po modifikovanoj Elmanovoj metodi, uz DTNB, merenjem apsorbanije na $\lambda=412\text{nm}$. Najzad aktivnost E-NTPDaze iz sinaptičkih membrana ispitivana je spektrofotometrijski u mikro eseju sa malahit grinom, u prisustvu Mg^{2+} jona, merenjem apsorbanije na 650 nm na plate reader-u.

Pored *in vitro* ispitivanja urađena je i *docking* studija kojom su određene energije vezivanja inhibitora (konstituenti lincure) za enzim E-NTPDazu2, pomoću *AutoDockVina* programa.

Antioksidativna aktivnost je ispitivana inhibicijom DPPH esej i pomoću ciklične voltametrije. Radioprotektivna aktivnost je određivana u kulturi neozračenih i ozračenih humanih limfocita, tretiranih ekstraktima i konstituentima. Praćeni su učestalost mikronukleusa u prisustvu navedenih ekstrakata, kao i indeks proliferacije pomoću citokinezis blok proliferativnog indeksa (CBPI). Praćen je i uticaj određenih konstituenata lincure na process apoptoze, pomoću protočnog citometra.

Antifungalna aktivnost je određivana metodom dilucije u agaru, nakon čega je određivan procenat inhibicije u odnosu na netretirani kontrolni uzorak i pozitivnu kontrolu sa fungicidom.

3.4. Primenjivost i značaj ostvarenih rezultata

Mogućnost inhibicije enzima mijeloperoksidaze ekstraktima lincure ukazuje na njenu antiinflamatornu aktivnost. Rezultati dobijeni inhibicijom AChE su značajni jer pokazano da sekoiridoidi mogu biti potencijalni prekursori za razvoj selektivnih inhibitora ovog enzima. Najzad odabir inhibitora enzima E-NTPDaze je značajan jer postoji nedostatak dovoljno specifičnih inhibitora ovih enzima, što predstavlja prepreku njihovoj daljoj primeni. Antifungalna aktivnost ekstrakta i konstituenata na odabrane vrste roda *Fusarium* bi mogla da bude od značaja u poljoprivredi i industriji hrane. Antiproliferativni efekti koje pojedini konstituenti lincure pokazuju mogli bi da budu od značaja pri selekciji novih citostatika.

4. Ostvareni naučni doprinos

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih rezultata

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su pokazali da su biološka aktivnost ekstrakata korena lincure, kao i mogućnosti njihove primene mnogo šire od tradicionalnog načina upotrebe ove biljke. U većini farmakopeja lekovita svojstva lincure su vezana za tretman gastrointestinalnih poremećaja. Međutim inhibitorna aktivnost koju ekstrakti *G. lutea* i pojedini konstituenti iz grupe sekoirioda pokazuju prema ispitivanim enzimima, mogu biti korisni u razvoju novih terapeutika.

Naime, ustanovljeno je da jedinjenja koja inhibiraju mijeloperoksidazu imaju antiinflamatorni efekat, dok su inhibitori acetilholinesteraze za sada jedini lekovi koji se koriste u tretmanu Alchajmerove bolesti. Kada je reč o E-NTPDazi, još se ispituju njeni mnogobrojni fiziološki efekti. U mozgu to je uticaj na purinergičku signalizaciju, čiji je poremećaj prisutan kod većine neurodegenerativnih bolesti. Takođe u organizmu ATP i drugi nukleozidi, predstavljaju važne signalne molekule koji učestvuju u regulaciji neadrenergičke i neholinergičke kontraktilnosti glatkih mišića, zatim nociceptivnih efekata, procesa koagulacije i drugih efekata. Posebni naučni doprinos rezultata ove disertacije predstavlja:

- identifikacija inhibitora mijeloperoksidaze –genciopikrozida i amarogentina
- identifikacija inhibitora AChE- loganske kiseline
- identifikacija inhibitora E-NTPDaze- amarogentina, izoviteksina i izogentizina
- antiproliferativna aktivnost koju pokazuje genciopikrozid i radioprotektivna aktivnost kiselog ekstrakta *G. lutea* i amarogentina
- genotoksični efekti koje pokazuju pojedini ekstrakti (50% EtOH)

- antifungalna aktivnost etanolno-vodenih ekstrakata posebno u slučaju *F. proliferatum*, *F. verticillioides* i *A. niger*.
- mogućnost analize sirovih ekstrakata *G. lutea*, MALDI-TOF masenom spektrometrijom bez prethodnog hromatografskog razdvajanja.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Istraživanja koja su izvedena u ovoj doktorskoj disertaciji i postavljeni ciljevi su definisani na osnovu prethodne detaljne analize literaturnih podataka. Analizirani ekstrakti su pripremljeni na način na koji se koriste u svakodnevnom životu. Posebno su odabrani enzimi čija aktivnost do sada nije ispitivana u prisustvu ekstrakta lincure ili u prisustvu jedinjenja koja su karakteristična ne samo za lincuru već se nalaze i u mnogim drugim biljkama koje pripadaju porodici *Gentianaceae*, što predstavlja poseban doprinos celom istraživanju. Odabrani enzimi predstavljaju dobar model sistem za ispitivanje inhibicije jer je MPO izolovana iz humane krvi a E-NTPDaza iz sinaptosoma, izolovanih iz mozga pacova. Ispitivanjem radioprotektivnih efekata ekstrakata lincure pokazano je da neki ekstrakti (kiseli) pokazuju radioprotektivno dok drugi (50% EtOH) imaju i genotoksično delovanje. Ustanovljeno je da genciopikrozid kao glavni konstituent ove biljke ispoljava snažnu antiproliferativnu aktivnost, koja se može uporediti sa citostaticima. Takođe je pokazano da pojedine komponente (izogenitizin) koje pripadaju ksantonima, drugoj najzastupljenijoj klasi jedinjenja u lincuri u povećanim koncentracijama imaju citotoksično delovanje. Najzad antifungalna aktivnost ekstrakata *G. lutea* mogla bi da se iskoristi za identifikaciju novih fungicida.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Branislav Nastasijević je svoje rezultate potvrdio objavljivanjem radova u časopisima međunarodnog značaja kao i saopštenjima na međunarodnim skupovima. U okviru izrade doktorske disertacije kandidat je prvi autor dva objavljena rada u međunarodnim časopisima, jednog rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M21) i jednog u časopisu međunarodnog značaja (M23). Kandidat je i koautor jednog rada u časopisu međunarodnog značaja (M23). Takođe prvi je autor tri rada saopštenja na međunarodnim skupovima, kategorije M33 i M34.

Spisak objavljenih radova direktno proisteklih iz teze:

Kategorija M21- radu vrhunskom međunarodnom časopisu

1. B. Nastasijević, T. Lazarević-Pašti, S. Dimitrijević-Branković, I. Pašti, A. Vujačić, G. Joksić, V. Vasić, Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2012) 66:191– 196. (IF₍₂₀₁₁₎=2,967) (ISSN 0731-7085).

Kategorija M23- rad u međunarodnom časopisu

2. B. Nastasijević, M. Milosević, G. Janjić, V. Stanić, V. Vasić, *Gentiana lutea* extracts and their constituents as inhibitors of synaptosomal Ecto-NTPDase, *International Journal of Pharmacology* (2016) 12 (4):272-289. (IF₍₂₀₁₄₎=0,709) (ISSN 1811-7775).
3. C. Akileshwari, P. Muthenna, B. Nastasijević, G. Joksic, J.K. Petrash, G.B. Reddy, Inhibition of Aldose Reductase by *Gentiana lutea* Extracts, *Exp Diabetes Res.*, 2012 (2012) 147965, doi:10.1155/2012/147965 (IF₍₂₀₁₁₎=1,2) (ISSN 1687-5214).

Kategorija M33- saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini

B. Nastasijević, T. Lazarević Pašti, A. Leskovac, S. Petrović, S. D. Branković, I. Pašti, G. Joksić, V. Vasić, Recent findings about healing properties of *Gentiana lutea* root extracts, 3rd Workshop "Specific Methods on Food Safety and Quality Sept. 27 (2012) Vinca, Belgrade, Serbia, Proceedings OP9, (ISBN 978-86-7306-118-4)

Kategorija M34-saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. B. Nastasijević, T. Lazarević Pašti, B. Damjanović, T. Kamčeva, G. Joksić, V. Vasić, MALDI-TOF mass spectrometry as a method for the quality control of *Gentiana lutea* extracts, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Sept. 21 (2010) Belgrade, Serbia, C6-P, (ISBN-10(13)/ISSN: 978-86-7306-113-9)
2. B. Nastasijević, T. Lazarević Pašti, B. Damjanović, T. Kamčeva, A. Hurajova, V. Vasić, Fingerprint Chromatography As A Method For The Quality Control And Standardization Of Herbal Extracts Of *Gentiana lutea*, 12th Danube-Kris-Mures-Tisa Euroregion Conference on Food, Environment and Health, Novi Sad, Serbia, Sept 14-15 (2010) Book of Abstracts.

4. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu svega izloženog, Komisija smatra da doktorska disertacija mr Branislava Nastasijevića, dipl. biohemičara, pod nazivom: „Biološki efekti ekstrakata korena lincure (*Gentiana lutea*)- inhibicija enzima, antioksidativna i antimikrobna aktivnost.“ predstavlja značajan, originalni naučni doprinos u oblasti Hemije i hemijske tehnologije, što je potvrđeno objavljivanjem radova u relevantnim časopisima međunarodnog značaja, kao i prezentovanjem rezultata na konferencijama. Kandidat je samostalno i sistematično uradio istraživanja i analizu dobijenih rezultata.

Imajući u vidu kvalitet i naučni doprinos ove doktorske disertacije Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću TMF-a da prihvati ovaj izveštaj i da ga, zajedno sa podnetom disertacijom mr Branislava Nastasijevića, prihvati, izloži na uvid javnosti i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 13.06.2016.

Članovi komisije

Prof. dr Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet

Dr Vesna Vasić, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Prof. dr Dušan Antonović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet