

**ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ**

35/259
(Број захтева)
10.08.2018.
(датум)

**Образац 2
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ
НАУКА**

(назив већа научне области коме се захтев упућује)

Београд, Студентски трг бр. 1

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду (“Гласник Универзитета у Београду” број 162/11, пречишћен текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата:

УНЕ-ЈОВАНЕ (Владимир) ВАЈИЋ, дипломираног инжењера технологије

КАНДИДАТ: **УНА-ЈОВАНА (Владимир) ВАЈИЋ** пријавила је докторску дисертацију под називом:

„Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“

Из научне области: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

Универзитет је дана **21.12.2015.** године, својим актом **61206-5690/2-15**, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **УНЕ-ЈОВАНЕ (Владимир) ВАЈИЋ** образована је на седници Наставно-научног већа одржаној **31.05.2018.** године Одлуком Факултета под бр. **35/193**, у саставу:

Име и презиме	Звање	Научна област
1. Др Бранко Бугарски	Редовни професор	Хемијско инжењерство
2. Др Невена Михаиловић-Станојевић	Научни саветник	Медицинске науке-медицина
3. Др Зорица Кнежевић-Југовић	Редовни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
4. Др Јелица Грујић-Милановић	Виши научни сарадник	Медицинске науке-медицина
5. Др Јелена Живковић	Научни сарадник	Биотехнологија

Студент је уписан на докторске академске студије шк. 2011/2012. године.

На захтев студента и уз сагласност ментора, декан је донео Решење бр. 20/126 од 29.09.2017. године о продужењу рока за завршетак студија за два семестра шк. 2017/2018. године.

Наставно-научно веће Факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **06.07.2018.** године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 104. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 40. Статута ТМФ-а и чл. 39. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 06.07.2018. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Невена Михаиловић-Станојевић, научни саветник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања, др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Јелица Грујић-Милановић, виши научни сарадник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања, др Јелена Живковић, научни сарадник Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: **„Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“** коју је поднела **Уна-Јована Вајић**, дипломирани инжењер технологије 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 Уне-Јоване Вајић, под називом **„Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“** Одлуком број: 61206-5690/2-15 од 21.12.2015. године.

Верификација научних доприноса:

Категорија M21a:

1. **Vajić, U.-J.** Grujić-Milanovic, J., Miloradovic, Z., Jovovic, Dj., Ivanov, M., Danijela, K., Katarina, S., Bugarski, B., Mihailovic-Stanojevic, N., 2018. *Urtica dioica* L. leaf extract modulates blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Phytomedicine*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.037>. IF 3,449; 6/83.
2. **Vajić, U.-J.** et al., 2015. Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 74, pp.912–917. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015301977>. IF 3,514; 1/26.

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 у Београду, ментору, Служби за наставно-студентске послове, Библиотеци и Архиви факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Уна-Јоване В. Вајић**, дипломираног инжењера технологије

Одлуком бр. 35/193 од 31.5.2018. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Уна-Јоване В. Вајић**, дипломираног инжењера технологије, под насловом:

„Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

6.9.2015. – Кандидат Уна-Јована В. Вајић, предложила је тему докторске дисертације под називом: „Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“.

17.9.2015. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/390 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Уна-Јоване В. Вајић за израду докторске дисертације под називом: „Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“.

3.12.2015. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/534 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрена је израда докторске дисертације Уна-Јоване В. Вајић, под називом: „Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“, за ментора поменуте докторске дисертације именован др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, а за коментора др Невена Михаиловић-Станојевић, научни саветник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања.

21.12.2015. – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Уна-Јоване В. Вајић, под називом: „Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“.

31.5.2018. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/193 о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Уна-Јоване В. Вајић, под називом: „Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“.

Кандидат Уна-Јована В. Вајић, уписала је докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, школске 2011/2012.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду. За ментора ове докторске дисертације именован је др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Ментор др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, из ове области публиковао је преко двадесет радова у часописима који су на *SCI* листи. Руководио је изработом девет одбрањених докторских дисертација, што говори о компетентности ментора да руководи изработом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Кандидат Уна-Јована В. Вајић, дипломирани инжењер технологије, је рођена 10.06.1986. године у Грачаници, Босна и Херцеговина. Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду уписала је школске 2005/2006. године, на којем је дипломирала 2010. године са просечном оценом 8,56. Школске 2011/12. године је уписала докторске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитет у Београду, на смеру Биохемијско инжењерство и биотехнологија, под руководством др Бранка Бугарског, редовног професора. На докторским студијама је успешно положила све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9,82, а завршни испит под називом: „Припрема, карактеризација хемијског састава

екстракта коприве и испитивање његовог дејства у условима експерименталне хипертензије“ је одбранила са оценом 10.

Од септембра 2011. запослена је као истраживач приправник у Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, на научно-истраживачком пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под називом „Испитивање антихипертензивног и ренопротективног потенцијала супстанци природног и синтетског порекла у експерименталним моделима кардиоваскуларних и бубрежних обољења“, ОИ 175096. Звање истраживач сарадник стекла је у октобру 2014, а реизабрана у ово звање у септембру 2017.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Уна-Јована В. Вајић, дипломираног инжењера технологије, садржи 189 страна (од којих је 167 страна нумерисано), у оквиру којих се налази 12 поглавља, 25 слика, 9 табела, 246 литературних навода и 4 прилога. Докторска дисертација садржи: Увод, Преглед литературних података, Циљеве рада, Експериментална испитивања, Резултате, Дискусију, Закључке, Литературу, Садржај слика, Садржај табела, Списак скраћеница и Прилоге. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском језику. По свом облику и садржају, поднети рад задовољава све стандарде за докторску дисертацију Универзитета у Београду.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** су образложени предмет и циљеви истраживања, као и научни допринос докторске дисертације.

У поглављу **Преглед литературних података** је дат литературни преглед предметне области који је изложен кроз пет целина: Хипертензија, Фенолна једињења, *Urtica dioica* L., Екстракција и Биолошки ефекти екстракта биљке *Urtica dioica* L. Објашњена је патологија хипертензије и значај њене превенције, као и сви важни механизми укључени

у регулацију крвног притиска. Такође, описано је под којим условима настаје оксидативни стрес и објашњена је његова улога у хипертензији. У оквиру овог поглавља су описана фенолна једињења, дата је њихова систематизација, као и њихова улога у физиологији биљака. Целина која се односи на *Urtica dioica* L. садржи морфолошке карактеристике ове биљке, њен хемијски састав са акцентом на фенолним једињењима која су до сада детектована у екстрактима ове биљке. Потом су детаљно објашњени процеси екстракције фенолних једињења, уз осврт на факторе који утичу на поменуте процесе, као и методе које се примењују. У оквиру целине која се односи на биолошке ефекте екстракта *Urtica dioica* L., истакнут је њен фармаколошки значај са акцентом на тренутно расположивим литературним подацима о њеним акутним антихипертензивним и хроничним антиоксидативним ефектима.

У оквиру **Циљева рада**, наведени су сви циљеви докторске дисертације. Основни циљ је био да се расветли потенцијална улога фенолних једињења пореклом из листа коприве (*Urtica dioica* L.) у превенцији и лечењу кардиоваскуларних обољења. С тим у вези, један од циљева је био оптимизација екстракционих параметара ради постизања максималног приноса фенолних једињења, као и хемијска карактеризација и одређивање антиоксидативних својстава добијених екстракта. Следећи циљ је био испитивање постојање антихипертензивног, антиоксидативног и антилипемичког одговора на хроничан третман екстрактом листа коприве у експерименталном моделу есенцијалне хипертензије код спонтано хипертензивних пацова (SHR), као и утицај дозне зависности на ове одговоре.

У оквиру поглавља **Експериментална испитивања** описани су материјали и методе коришћене у истраживачком раду: методе екстракције (мацерација и екстракција у ултразвучном купатилу); метода сушења екстракта (лиофилизација); методе одређивања садржаја укупних фенола и флавоноида; методе течне хроматографије-масене спектроскопије (LC/MS) и течне хроматографије високих перформанси (HPLC/DAD); методе испитивања антиоксидативне активности (TEAC, DPPH, FRAP, способност хелирања јона метала и способност неутралисања суупероксидног радикала); дизајн

експеримента и *RSM* модел. Експериментални протокол везан за *in vivo* студију садржи изјаву о спровођењу огледа на животињама у складу са законом о добробити животиња ("Службени гласник", Бр. 41/09), одобрење о спровођењу огледа Управе за ветерину, Министарства пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије (бр. 323-07-02449/2014-05) и описе: хемодинамских мерења; узорковања крви, урина и ткива бубрега; метода за одређивање биохемијских параметара (стандардни биохемијски параметри, параметри бубрежне функције, липидног статуса, метаболита азот монооксида, степена липидне пероксидације, активности и концентрација циљних ензима) спектрофотометријски, *ELISA* тестовима и *western blot*-ом, као и метода примењених у сврху статистичке обраде добијених података.

У поглављу **Резултати**, прво су приказани резултати оптимизације процеса екстракције фенолних једињења из листа *Urtica dioica* L. Анализом резултата утврђено је да су у листу коприве најзаступљенија фенолна једињења рутин, хлорогенска и 2-О-кафеоил мална киселина. Поред тога, детектовани су у доста нижим концентрацијама *p*-кумароил малат, кафена киселина, изокверцетин, кемферол-3-О-рутинозид, изорамнетин-3-О-рутинозид и изораметин хексозид. Растварач вода-метанол је показао знатно боље екстракционе карактеристике од воде-етанола, као и чисте воде када је у питању садржај укупних фенола, као и појединачних фенолних једињења. Екстракти добијени ултразвучном екстракцијом су имали значајно више садржаје укупних фенолих једињења и флавоноида, хлорогенске и кафене киселине, али не и рутина при поређењу са екстрактима припремљеним мацерацијом. Поред тога, екстракти припремљени овом екстракционом техником су имали значајно више антиоксидативне капацитете. Оптимизацијом екстракционих параметара је показано да се максималан принос укупних фенолних једињења из листа *Urtica dioica* L. постиже коришћењем 54%-тног метанола и ултразвучном екстракцијом у трајању од 38 минута. Поред тога, показано је да садржај метанола у растварачу значајно утиче на принос фенолних једињења у екстрактима, док трајање екстракције није показало значајан утицај на садржај ових једињења. Суви екстракт листа коприве (*UE*) припремљен екстракцијом коришћем

оптималних екстракционих параметара (54% метанол, трајање екстракције 38 min и примена ултразвучне екстракције) је имао значајно виши антиоксидативни капацитет у поређењу са *BHT*, али лошији у поређењу са витамином Ц. Такође, овај екстракт је показао изражен афинитет за хелирање јона гвожђа, као и висок садржај нитрита. Четворонедељни третман SHR са све три *UE* дозе довео до значајног снижења систолног и дијастолног крвног притиска, док је третман са 50 и 200 mg/kg *UE* на дан довео и до снижења средњег артеријског притиска експерименталних животиња. Поред тога, услед третмана са *UE* дошло је до значајног смањења минутног волумена срца и благог снижења ударног волумена срца, без промена у укупном периферном отпору, срчаној фреквенци и протоцима и отпорима кроз аорту, каротидну и ранау артерију SHR. Четворонедељни третман са *UE* је довео до значајног повећања садржаја метаболита азотног монооксида (NO_x и NO_2) у плазми и урину SHR. Све три *UE* дозе су довеле до значајног повећања активности ензима антиоксидативне заштите (супероксид дисмутазе и каталазе) у еритроцитима, као и до повећања антиоксидативног капацитета плазме. Поред тога, *UE* третман је довео и до снижења оксидативног стреса у плазми SHR. Четворонедељни третман са највишом *UE* дозом је резултовао значајним повећањем оксидативног стреса у еритроцитима и урину, и смањеном експресијом глутатион пероксидазе у еритроцитима SHR. Третман са све три *UE* дозе је довео до значајног повећања нивоа *HDL* холестерола, док је доза од 200 mg/kg на дан имала нешто неповољнији утицај на липидни статус јер је довела до повећања триглицерида у плазми SHR. У ткиву бубрега експерименталних животиња третмана са две више *UE* дозе (50 и 200 mg/kg на дан) довео је до повећања експресије *eNOS* ензима, док је третман са све три дозе довео до смањења експресије *nNOS* ензима.

У поглављу **Дискусија** извршена је детаљна и свеобухватна критичка анализа добијених резултата у односу на резултате сличних истраживања објављене у међународним научним часописима. На основу тога, изнесени су закључци и хипотезе које објашњавају резултате ове докторске дисертације у контексту података који постоје у савременој литератури, а тичу се сличне проблематике. Такође, резултати истраживања непознати

научној литератури, а који су показани по први пут овом дисертацијом, анализирани су и објашњени на одговарајући начин.

У поглављу **Закључци** таксативно су наведени најважнији закључци изведени из резултата испитивања изложених у претходним поглављима.

У поглављу **Литература** наведене су све референце коришћене током израде докторске дисертације.

У поглављу **Садржај слика** су таксативно наведене све слике приказане у дисертацији, као број стране на којој се налазе.

У поглављу **Садржај табела** су таксативно наведене све табеле приказане у дисертацији, као и број стране на којој се налазе.

У поглављу **Списак скраћеница** се налазе таксативно наведене и дефинисане све скраћенице коришћене у овој докторској дисертацији.

У поглављу **Прилози** се налазе Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, као и Изјава о коришћењу докторске дисертације.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Докторска дисертација Уна-Јоване В. Вајић има за предмет савремену тему истраживања која се односи на оптимизацију екстракције фенолних једињења из листа *Urtica dioica* L. и испитивање дозно-зависних антихипертензивних и антиоксидативних ефеката екстраката у *in vivo* моделу експерименталне хипертензије. Од хипертензије болује милијарду људи широм света, од чега сваке године умре чак 9,4 милиона и то обично услед компликација изазваних хипертензијом као што су мождани или срчани удар. Удружена са факторима ризика као што су неправилна исхрана, пушење, дислипидемија,

гојазност, изостанак физичке активности, хипертензија значајно доприноси прогресији кардиоваскуларних обољења. Повећање броја оболелих од хипертензије у свету је у сталном порасту. Сматра се да је узрок томе повећање светске популације и њено старење, нездрав начин исхране, недостатак физичке активности, гојазност и изложеност стресу.

Urtica dioica L. је вишегодишња глобално распрострањена биљка са дугом традицијом примене у третману великог броја здравствених проблема. Лист коприве садржи прилично широк спектар хемијских једињења, а од фенолних једињења, највише су заступљена кафена и хлорогенска киселина, као и катехин. Поред тога, потврђено је и присуство флавоноида, протеина, минерала, масних киселина и каротеноида, терпена, витамина Ц, К и витамина Б групе. Бројне студије су се бавиле испитивањем позитивног терапијског дејства ове биљке. Када су у питању кардиоваскуларни ефекти, до сада публиковане *in vitro* студије су показале вазодилататорна и антихипертензивна својства екстракта корена ове биљке. Такође, показана су диуретичка и натриуретичка својства екстракта коприве, која би могла да доведу до снижења крвног притиска. Такође у *in vivo* условима, показана је и антиоксидативна активност екстракта коприве.

Будући да се савремени начин живота повезује са неадекватном исхраном и све учесталијом појавом бројних хроничних обољења, а посебно кардиоваскуларних, појављује се потреба за применом алтернативних природних супстанци, и антиоксиданса којим би се постигло циљано заштитно дејство на организам. Због тога су изолација и идентификација биолошки активних једињења из биљака, те њихова даља примена у циљу обогаћивања различитих производа овим једињењима, или пак њихово коришћење као замене за неке од синтетских антиоксиданаса и могућност њихове примене као додатака исхрани, тренутно једна од најактуелнијих научно-истраживачких тема. Од биолошки активних једињења, у последње време посебно су актуелна испитивања фенолних једињења, секундарних метаболита биљака која поседују антиоксидативна својства, и којима се приписују повољни ефекти на здравље. Улога фенолних једињења у благотворним ефектима исхране богате воћем и поврћем на људско здравље је постала веома значајно поље истраживања. Генерално, прихваћен је став да се благотворни

ефекти овакве исхране управо и приписују овим једињењима и посебно је интересантна за прехранбену индустрију управо због доказаних позитивних ефеката на дијабетес, кардиоваскуларне болести, рак и др.

Због свега горе наведеног, од кључног је интереса постићи максималан принос фенолних једињења при њиховој екстракцији из полазног материјала. Међутим, структурна и физикохемијска разноврсност у оквиру ове групе једињења, као и разлике у структури биљног матрикса, не остављају могућност коришћења општег екстракционог протокола. Зато се при екстракцији захтева специфичан приступ сваком појединачном извору ових једињења. Бројни су фактори који утичу на ефикасност екстракције фенолних једињења, а најзначајнији међу њима су растварач, метода екстракције, температура, трајање екстракције, однос дрога/растварач, степен уситњености полазног биљног материјала, мешање и pH вредност. У циљу постизања максималног приноса ових једињења, неопходно је одредити оптималне вредности поменутих фактора. Управо због свега поменутог, истраживања у оквиру ове дисертације су била усмерена ка оптимизацији екстракционих параметара са циљем постизања максималног приноса фенолних једињења у екстракту листа *Urtica dioica* L. Поред тога, вршена је карактеризација фенолних једињења и одређивање антиоксидативног капацитета екстраката. Екстракт са највишим садржајем фенолних једињења је испитиван у моделу експерименталне хипертензије са циљем утврђивања његовог утицаја на оксидативни и хемодинамски статус, биохемијске параметре и липидни статус. Резултати ове дисертације дају увид научној јавности, али и индустријском сектору, о доминантним фенолним једињењима и оптималним условима за екстракцију истих из листа *Urtica dioica* L., биљке богате биолошки активним једињењима и повољне за узгој, са идејом шире примене сувих екстраката ове биљке, који би допринели квалитету и нутритивној вредности постојећих производа, или као замену за синтетске адитиве.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације Уна-Јоване В. Вајић, дипломираног инжењера технологије, цитирано је 246 литературних навода који су омогућили да се прикаже стање

у испитиваној области, као и актуелност проблематике. Савремена истраживања објављена у наведеним научним радовима су описана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су омогућили добар увид у потенцијалну примену фенолних једињења пореклом из листа *Urtica dioica* L. како у прехранбеној, тако и у фармацеутској индустрији. На основу пажљиве анализе резултата приказаних у научној литератури изложене су основне смернице за истраживања која су извршена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави коју је кандидат поднео, као и из наведене литературе која је коришћена у истраживању, уочава се изузетно велико познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелних истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати у оквиру ове дисертације су добијени одговарајућим експериментима, применом савремених аналитичких метода, према оригиналним или модификованим процедурама из литературе. Екстракти листа *Urtica dioica* L. добијени су применом две методе екстракције: мацерације и екстракције применом ултразвука у ултразвучном купатилу. Као алат за експериментални дизајн, одређивање вредности параметара екстракције потребних за максималан принос фенолних једињења у екстрактима листа *Urtica dioica* L., као и утицаја појединачних фактора екстракције на принос ових једињења, коришћен је дизајн експеримента и RSM модел. Садржај фенолних једињења и флавоноида у добијеним екстрактима одређен је индиректним спектрофотометријским методама. Хемијска карактеризација одабраних екстраката урађена је применом LC/MS и HPLC/DAD метода, док је антиоксидативна активност испитана TEAC, DPPH и FRAP методама, методом за одређивање способности неутралисања супероксидног радикала, као и методом за одређивање способности хелирања јон гвожђа. За испитивање *in vivo* ефеката хроничног третмана са екстрактом листа *Urtica dioica* L., одређивани су хемодинамски параметари коришћењем савремених апарата: уређај за мерење хемодинамских параметара животиња (9800TCR *Cardiomax III*-TCR) и ултразвучни мерач протока крви кроз крвне судове малих експерименталних животиња. Биохемијски

параметри су одређивани спектрометријски на уређају *COBAS INTEGRA 400 plus*. За одређивање концентрације метаболита азотног монооксида, степена липидне пероксидације и активности ензима антиоксидативне заштите коришћене су такође спектрофотометријске методе. За одређивање концентрације ензима антиоксидативне заштите коришћени су комерцијални *ELISA* тестови, док је за одређивање експресије *eNOS*, *nNOS* и *iNOS* ензима у ткиву бубрега коришћена *western blot* анализа. Статистичка обрада података је вршена коришћењем софтвера *STATISTICA 7.0*.

3.4. Примењивост остварених резултата

Оптимизацијом параметара екстракције фенолних једињења из листа *Urtica dioica* L. добијене су вредности ових параметара при којима се добијају екстракти са највишим садржајем фенолних једињења. Приказане процедуре се могу применити у индустријским условима за добијање већих количина екстраката богатих овим једињењима. Испитивањем биолошких ефеката различитих доза екстракта утврђено је повољно дејство на хемодинамски, оксидативни и липидни статус у условима хипертензије, што отвара широке могућности примене екстраката листа *Urtica dioica* L. у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Резултати ове дисертације промовишу дозу од 10 mg/kg т.м. на дан оптималном и корисним потенцијалним додатком исхране хипертензивних субјеката.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Спровodeћи иновативна истраживања током израде докторске дисертације, кандидат Уна-Јована В. Вајић, дипломирани инжењер технологије, показала је изузетну стручност у реализацији експеримената кроз модификацију и оптимизацију примењених процедура и метода, као и кроз анализу и начин представљања резултата. Током својих истраживања, спроведених врло одговорно и зрело, испољила је како самосталност у раду, систематичност и креативност, тако и критичност. Током докторских студија, Уна-Јована В. Вајић се истицала способношћу да на прави начин представи и у потпуности објасни све аспекте бројних експерименталних резултата. На основу бројних

постигнутих резултата и изузетног залагања, те доприноса развоју науке, Комисија је мишљења да кандидат Уна-Јована В. Вајић поседује све неопходне квалитете за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Научни доприноси резултата истраживања остварених у оквиру ове дисертације се огледају у:

- утврђивању утицаја различитих растварача на принос фенолних једињења из листа *Urtica dioica* L.
- разумевању утицаја различитих метода екстракције на принос фенолних једињења: мацерације и екстракције у ултразвучном купатилу
- одређивању вредности параметара екстракције који обезбеђују максималан принос фенолних једињења из листа *Urtica dioica* L.
- одређивању утицаја процента метанола и трајања екстракције на принос фенолних једињења у екстрактима листа *Urtica dioica* L.
- хемијској карактеризацији добијених екстраката листа *Urtica dioica* L., као и одређивању њихових антиоксидативних капацитета
- одређивању антиоксидативних ефеката екстракта са највишим садржајем фенолних једињења
- Одређивању дозно-зависних ефеката хроничног четворонедељног третмана са три различите дозе екстракта са највишим садржајем фенолних једињења на хемодинамске параметре као што су крвни притисак, минутни волумен срца, фреквенца срчаних контракција, ударни волумен, као и протоке и отпоре кроз поједине крвне судове
- Одређивању дозно-зависних ефеката хроничног четворонедељног третмана са три различите дозе екстракта са највишим садржајем фенолних једињења на

параметре оксидативног статуса (активности ензима антиоксидативне заштите, антиоксидативни капацитет и оксидативни стрес)

- Одређивању дозно-зависних ефеката хроничног четворонедељног третмана са три различите дозе екстракта са највишим садржајем фенолних једињења на експресију ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима као и *eNOS*, *nNOS* и *iNOS* у бубрегу
- Одређивању дозно-зависних ефеката хроничног третмана са три различите дозе екстракта са највишим садржајем фенолних једињења на концентрацију метаболита азотног монооксида и анализи утицаја на липидни статус и опште биохемијске параметре

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Истраживања приказана у овој докторској дисертацији реализована су након темељне анализе расположиве научне литературе везане за предметну област и примене одговарајућих статистичких метода. Сprovedена је свеобухватна студија утицаја различитих процесних параметара и метода екстракције на принос фенолних једињења листа *Urtica dioica* L., уз испитивање интеракција између фактора, са циљем да се идентификује најефикаснији процес екстракције зарад добијања максималног садржаја фенолних једињења у екстрактима ове биљке. Хемијска карактеризација фенолних једињења екстракта листа *Urtica dioica* L. је показала да се она могу сврстати у две класе: деривате хидроксицинаминске киселине (хлорогенска киселина, 2-О-кафеоил мална киселина, кафена киселина и *p*-кумароил малат) и флавоноиде (рутин, изокверцетин, кемферол-3-О-рутинозид, изорамнетин-3-О-рутинозид и изораметин хексозид). Од тога, најзаступљенији су рутин, хлорогенска и 2-О-кафеоил мална киселина. Поред тога, вода-метанол се показала као боље екстракционо средство од воде и воде-етанола, када су у питању садржај укупних фенола, као и појединачних фенолних једињења. Применом дизајна експеримента и *RSM* модела (метод одзивних површина), закључено је да су оптимални услови за максималан принос фенолних једињења трајање екстракције од 38 минута уз употребу 54%-тног метанола. Садржај метанола у растварачу значајно је утицао

на принос фенолних једињења у екстрактима, за разлику од трајања екстракције. Такође, ултразвучна екстракција се показала бољом екстракционом методом од мацерације јер су са њом постигнути виши садржаји укупних фенола и флавоноида, као и појединачних фенолних једињења у екстрактима. Коначно, показано је да екстракт добијен ултразвучном екстракцијом са 54%-тним метанолом и трајањем екстракције од 38 минута има високу антиоксидативну активност при поређењу са конвенционалним антиоксидансом, као и изузетан афинитет ка хелирању јона гвожђа.

Сprovedена *in vivo* студија у експерименталном моделу есенцијалне хипертензије по први пут је показала да четворонедељна орална суплементација SHR са три различите дозе (10, 50 и 200 mg/kg екстракта на дан) екстракта листа *Urtica dioica* L. (добијеним под оптималним процесним параметрима) доводи до снижења крвног притиска и растерећења миокарда (смањења минутног волумена срца). Ова дисертација је такође показала да је екстракт листа коприве, поред фенолним једињења, богат и нитритима и да је третман различитим дозама довео до повећања метаболита NO-а у плазми и урину SHR. Раније се сматрало да су нитрати и нитрити пореклом из хране инертни производи ланца исхране са потенцијално штетним ефектима на здравље. Како дозно-зависно снижење притиска није било праћено смањењем отпора у артеријској циркулацији, наметнуо се закључак да је синтеза NO-а насталог редукцијом нитрита из екстракта (у хипоксичним условима у присуству деоксихемоглобина, при преласку крви из артеријске у венску циркулацију) могла довести до венске дилатације и последично смањеног минутног волумена срца одговорног за пад притиска. Резултати ове дисертације даље показују важну улогу полифенола присутних у екстракту, пре свега хлорогенске киселине, као једињења ефикасних у инхибицији реакција нитрозилације чиме екстракт коприве богат нитритима чине погодним егзогеним извором вазоактивног молекула NO-а. Овај третман је побољшао липидни статус, такође побољшао је и оксидативни статус експерименталних животиња повећањем активности ензима антиоксидативне заштите, повећањем антиоксидативног капацитета плазме и снижењем липидне пероксидације плазме. Третман екстрактом коприве стимулисао је експресију *eNOS*, а смањио експресију *nNOS* ензима у бубрезима експерименталних животиња.

Добијени резултати отворили су врата новим правцима истраживања, пре свега инкапсулацији екстракта зарад постизања контролисаног отпуштања фенолних једињења, као и даља испитивања механизма постигнутих *in vivo* ефеката екстракта.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Уна-Јована В. Вајић, дипломирани инжењер технологије, резултате свог истраживања током израде ове дисертације потврдила је објављивањем радова у часописима међународног значаја, као и саопштавањем радова на међународним и домаћим скуповима. Резултате свог досадашњег научноистраживачког рада у оквиру докторске дисертације објавила је у укупно 5 публикација, од тога два (2) рада у међународним часописима изузетних вредности (M21a), два (2) саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34) и једно (1) саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64).

Списак радова који су резултат истраживања у оквиру докторске дисертације

Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a):

1. Vajic, U.-J. Grujic-Milanovic, J., Miloradovic, Z., Jovovic, Dj., Ivanov, M., Danijela, K., Katarina, S., Bugarski, B., Mihailovic-Stanojevic, N., 2018. *Urtica dioica* L. leaf extract modulates blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Phytomedicine*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.037>. IF 3,449; 6/83.
2. Vajić, U.-J. et al., 2015. Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 74, pp.912–917. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015301977>. IF 3,514; 1/26.

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34):

1. **Vajic, U.**, Grujic-Milanovic, J., Miloradovic, Z., Ivanov, M., Bugarski, B., Jovovic, D., Mihailovic-Stanojevic N., 2015. Effects of *Urtica dioica* L. Leaf extract on systemic haemodynamic parameters in experimental malignant hypertension. *2nd European section*

meeting of the international academy of cardiovascular sciences "Heart diseases: how new research may lead to new treatments" Belgrade, Serbia October 8-10, Abs. Book p. 146.

2. **Vajic, U.**, Grujic-Milanovic, J., Miloradovic, Z., Jovovic, D., Ivanov, M., Karanovic, D., Mihailovic-Stanojevic, N., 2016. *Urtica dioica* L. Leaf extract reduces blood pressure and improves antioxidative defence in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, June 2016, 34, e316.

Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (**M64**):

1. **Vajić U.-J.**, Živković J., Šavikin K.a, Jovović Đ., Miloradović Z., Grujić-Milanović J., Ivanov M., Mihailović-Stanojević N., 2014. Optimization of extraction of phenolic compounds from *Urtica dioica* leaf using response surface methodology. „*Natural Products and Drug Discovery-Future Perspectives*“, Vienna, Austria, 13-14. November 2014. Abs. Book P64.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега наведеног Комисија сматра да докторска дисертација кандидата **Уна-Јоване В. Вајић**, дипломираног инжењера технологије, под насловом "**Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији**" представља значајан и оригиналан научни допринос у датој области, што је и потврђено кроз објављивање радова у часописима међународног значаја. Предмет и циљеви који су постављени јасно су наведени и у потпуности остварени. Комисија је мишљења да докторска дисертација под називом "**Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији**" у потпуности испуњава све захтеване критеријуме, као и да је кандидат током израде дисертације показао изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати овај Реферат, пружи на увид јавности

поднету докторску дисертацију кандидата **Уна-Јоване В. Вајић**, дипломираног инжењера технологије, у законом предвиђеном року, као и да Реферат упути Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду и да након завршетка процедуре позове кандидата на усмену одбрану дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 04.06.2018.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Бранко Бугарски, редовни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Невена Михаиловић-Станојевић, научни саветник,
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања

Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Јелица Грујић-Милановић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања

Др Јелена Живковић, научни сарадник,
Институт за проучавање лековитог биља "Др Јосиф Панчић"