

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На III редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 15.12.2020. године, прихваћен је извештај ментора др Биљане Николић о урађеној докторској дисертацији Бојане П. Василијевић, истраживача сарадника Универзитета у Београду – Биолошког факултета, под насловом: „Хемијска карактеризација, антимикуробна и цитотоксична активност етарског уља и постдестилационог остатка клеке (*Juniperus communis* L.) и њихово комбиновано деловање са конвенционалним антибиотицима и цитостатицима“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Биљана Николић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Јелена Кнежевић-Вукчевић, редовни професор у пензији, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Драгана Митић-Ђулафић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Дејан Орчић, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, др Татјана Срдић-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Бојане П. Василијевић под насловом „Хемијска карактеризација, антимикуробна и цитотоксична активност етарског уља и постдестилационог остатка клеке (*Juniperus communis* L.) и њихово комбиновано деловање са конвенционалним антибиотицима и цитостатицима“ представља истраживање произашло из сталне потребе за открићем нових биолошки активних супстанци са антимикуробним и цитотоксичним потенцијалом, која је нарочито изражена у условима повећане резистенције патогених микроорганизама и ћелија канцера према конвенционалним

терапеутицима. Додатно, део истраживања стимулисан је потребом за проналажењем природних производа који могу заменити синтетичке конзервансе у заштити хране од микробиолошке контаминације. Ова докторска дисертација је урађена на Катедри за микробиологију, Универзитета у Београду – Биолошког факултета, као и на Катедри за биохемију и хемију природних производа, Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, експерименталној лабораторији Института за онкологију и радиологију Србије, Миколошкој лабораторији Одељења за физиологију биљака, Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију, Катедри за управљање безбедношћу и квалитетом хране, Универзитета у Београду – Пољопривредног факултета и на Одсеку за пољопривредна истраживања и развој Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду. Истраживања су изведена у оквиру пројекта „Биолошки активни природни производи као потенцијални извори нових лекова и дијететских суплемената“, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ОИ 172058, 2011-2019.), под руководством проф. др Неде Мимице-Дукић.

Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о ментору и члановима комисије, изјаву захвалности, сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима, списак скраћеница и ознака, садржај, текст рада по поглављима, литературу и прилоге. Написана је на 146 страна (проред 1), садржи 43 слике и 52 табеле. Дисертација је подељена на осам поглавља: Увод (1-24 страна), Циљеви истраживања (странице 25 и 26), Материјал и методе (27-55 страна), Резултати (56-88 страна), Дискусија (89-104 страна), Закључци (странице 105 и 106), Литература (107-125 страна) и Прилози (126-146 страна). Поред наведеног, теза садржи и Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

## **Анализа докторске дисертације**

Поглавље **Увод** садржи значајне литературне податке који су непосредно повезани са темом докторске дисертације и има девет потпоглавља. У потпоглављу „Антибактеријски агенси и механизми њиховог деловања“ јасно су дефинисани антимикуробни агенси, њихова подела према хемијској структури, спектру антимикуробног деловања и механизмима којима се оно остварује. Најчешћи механизми деловања различитих класа антимикуробних агенаса су наведени и јасно објашњени. У потпоглављу „Механизми резистенције бактерија на

антимикробне агенсе“ дефинисани су термини урођене и стечене резистенције и наведени главни механизми који леже у њиховој основи. Поред бактеријских, и инвазивне гљивичне инфекције представљају важан узрочни фактор оболевања, а резистенција на антифунгалне лекове постаје све већи проблем. Због тога, слично као и у претходна два, у потпоглављима „Антифунгални агенси и механизми њиховог деловања“ и „Механизми резистенције гљива на антифунгалне агенсе“ прегледно су дати механизми деловања различитих антифунгалних агенаса као и механизми резистенције гљива на антимикотике.

Процес настанка тумора, канцер плућа и патохистолошка класификација канцера плућа описани су у потпоглављу „Канцерогенеза и канцер плућа“. Даље је приказана подела цитостатика и објашњени су механизми њиховог дејства (потпоглавље „Цитостатици и механизми њиховог деловања“). Будући да је главни узрок неуспешног лечења малигних болести појава резистенције туморских ћелија на антиканцерске агенсе, које различитим механизмима спречавају или смањују њихово дејство, у наставку, у потпоглављу „Механизми резистенције канцерских ћелија на цитостатике“, приказани су најчешћи механизми на којима се заснива резистенција канцерских ћелија на цитостатике.

Због развоја резистенције према конвенционалним антимикробним агенсима и цитостатикима јављају се проблеми везани са смањеном ефикасношћу/неефикасношћу прописаних терапија, а као једно од могућих решења наводе се биљке као извори биолошки активних материја. У потпоглављу „Биљке као извори биолошки активних материја“ прегледно су приказани примери биљних терапеутика и анализирани разлози повећаног интересовања за употребу природних производа у лечењу. Истакнут је све већи значај истраживања биолошки активних супстанци из биљака, нарочито када се има у виду да је само мали проценат биљних врста истражен са фитохемијског и фармаколошког аспекта. У оквиру овог потпоглавља налазе се два подналова: „Секундарни метаболити биљака и механизми њиховог деловања“ и „Род *Juniperus*“. У оквиру првог акценат је стављен на терпенска и фенолна једињења, доминантне састојке етарских уља и биљних екстраката, а приказан је њихов антимикробни и антиканцерски ефекат и то кроз следеће целине: „Етарска уља и механизми њиховог деловања на бактерије“, „Фенолна једињења и механизми њиховог деловања на бактерије“, „Секундарни метаболити и механизми деловања на гљиве“ и „Антиканцерски ефекат биљних деривата“. Наведени су бројни литературни подаци који поткрепљују примену и објашњавају механизме антимикробне и антиканцерске активности како терпена, тако и биљних полифенола.

У оквиру подналова „Род *Juniperus*“ најпре су наведене значајне карактеристике и таксономска класификација рода, а затим су детаљно описани географска распрострањеност,

морфологија и систематика обичне клеке (*J. communis*). Посебну целину чини прегледни опис биолошких активности клеке („Биолошке активности *J. communis*“), где су наведени бројни примери њене могуће употребе у савременој медицини, али и у прехранбеној индустрији. На крају овог одељка дат је преглед литературних података који се односе на антибактеријску, антифунгалну, антиоксидативну, анти-инфламаторну, цитотоксичну, антипролиферативну, антиканцерску, хепатопротективну, неуропротективну и аналгетску активност *J. communis*.

Имајући у виду да *J. communis* има примену у прехранбеној индустрији, и да је у овој дисертацији испитиван антимикробни потенцијал деривата клеке према контаминентима хране, они су прегледно приказани у потпоглављу „Микроорганизми контаминенти хране“. Акцент је стављен на патогене бактерије и гљиве изазиваче кварења хране и узрочнике инфекција људи и животиња. Дат је кратак опис микромицета из родова *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Candida* (поднаслов „Гљиве као контаминенти хране“), као и, значајних хуманих патогених бактерија из родова *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* и *Pseudomonas* (поднаслов „Патогене бактерије преносиве храном“).

У поглављу **Циљеви истраживања** дефинисани су следећи главни циљеви:

- 1) хемијска карактеризација и одређивање антиоксидативног потенцијала деривата биљке *Juniperus communis* L. и то њених етарских уља и постдестилационог остатка, а додатно и карактеризација етарског уља биљке чубар (*Satureja montana*), коришћеног као позитивна контрола у појединим фазама истраживања;
- 2) анализа антимикробног потенцијала деривата *J. communis*, појединачно и у комбинацији са другим антимикробним агенсима, са посебним освртом на могућност примене у храни, где би се уље користило као природни конзерванс;
- 3) анализа цитотоксичног потенцијала деривата *J. communis*, појединачно и у комбинацији са конвенционалним цитостатацима.

За реализацију главних циљева дефинисани су бројни конкретни задаци који укључују:

- Припрему биљног материјала за тестирање,
- Хемијску карактеризацију биљних деривата, која је обухватила одређивање терпенског састава етарских уља и фенолног састава постдестилационог остатка, као и одређивање укупних флавоноида у њему,
- Одређивање антиоксидативног потенцијала деривата *J. communis*,
- Испитивање антибактеријског и антифунгалног ефекта деривата *J. communis*, примењених појединачно и у бинарним комбинацијама са конвенционалним антибиотицима/фунгицидима,

- Одређивање селективности уоченог антимикуробног ефекта у односу на цитотоксичност према анализираним ћелијским линијама човека,
- Утврђивање ефекта деривата *J. communis* на адхезију ентеропатогена на хумане ћелије колона у култури,
- Испитивање могућности примене етарског уља *J. communis* у храни, самог и у комбинацији са етарским уљем *S. montana*, кроз антимикуробне тестове спроведене *in vitro* и *in situ* на месу,
- Испитивање цитотоксичног ефекта деривата *J. communis* и процену селективне токсичности према канцерским, у односу на нормалне ћелије,
- Анализу типа интеракције у бинарним комбинацијама деривата *J. communis* са конвенционалним цитостатиком доксорубицином,
- Испитивање ефекта деривата *J. communis* на апоптозу и ћелијски циклус и утврђивање њихове генотоксичности.

У поглављу **Материјал и методе** наведени су материјал и методе коришћени за реализацију постављених циљева. У потпоглављу Материјал наведени су: (1) биљни материјал коришћен за хидродестилацију етарског уља клеке и сакупљање постдестилационог остатка, (2) комерцијално набављена етарска уља клеке и чубра и (3) биолошки материјал са набројаним сојевима бактерија и микромицета и ћелијским линијама коришћеним у овом раду. Затим, приказани су (4) раствори и реагенси коришћени у хемијским тестовима, (5) материјал за гајење микроорганизама (течне и чврсте подлоге за гајење бактерија и гљива, раствори и реагенси коришћени за испитивање антимикуробног потенцијала, одабрани конвенционални антимикуробни агенси, додатни материјал за испитивање антибактеријског потенцијала *in situ* на месу) и (6) материјал за гајење сисарских ћелија (хранљиве подлоге, раствори и реагенси и коришћени конвенционални цитостатици).

У другом потпоглављу (Методе) детаљно су описане методе хемијске анализе и детекције антиоксидативне активности, методе за детекцију антимикуробног потенцијала и за испитивање цитотоксичности. Одељак „Хемијске анализе и детекција антиоксидативне активности“ садржи неколико пододељака. Најпре је приказан опис корака у припреми етарског уља и постдестилационог остатка (PDO) биљке *J. communis* var. *saxatilis*. Затим су објашњене методе за детекцију квалитативног и квантитативног састава етарских уља (GC-MS и GC-FID), одабраних фенолних једињења PDO (LC-MS/MS метода), као и садржаја укупних флавоноида у њему. У наредним пододељцима су описане спектрофотометријске методе коришћене за детекцију антиоксидативног потенцијала и то (1) DPPH тест, коришћен за одређивање способности неутрализације DPPH радикала, (2) ТВА тест, коришћен за

одређивање способности инхибиције липидне пероксидације и (3) FRAP тест за одређивање редукционог капацитета.

У одељку „Детекција антимикуробног потенцијала“ најпре су приказани општи протоколи гајења микроорганизама и припреме инокулума за микродилуционе есеје, а затим ја дат детаљан опис самих микродилуционих есеја – МИК и *Checkerboard* теста (методе шаховске табле), који су коришћени за испитивање ефекта појединачно примењених биљних деривата и конвенционалних антибиотика/антимикотика, као и њихових бинарних комбинација и то на одабраним сојевима бактерија и микромицета. Објашњена је интерпретација вредности индекса фракционе инхибиторне концентрације (FIC<sub>i</sub>), која омогућава анализу типа интеракције између антимикуробних агенаса примењених у комбинацији. Следи опис методе за праћење динамике преживљавања бактерија у присуству одабраних тест супстанци и њихових комбинација, која је коришћена за потврду типа интеракције у комбинацијама агенаса и одређивање динамичких МИК вредности. Затим је у оквиру пододељка „Испитивање антимикуробне активности природних производа *in situ*“ описана припрема одабраног модела хране, тј. јунећег меса, као и његова инокулација бактеријом *Listeria monocytogenes*, објашњен је процес маринирања (кораци који су претходили микробиолошкој анализи), као и метода за праћење временски зависне инхибиције раста одабраних група бактерија (инокулисане *L. monocytogenes*, аеробних хетеротрофних мезофила, фамилије Enterobacteriaceae и бактерија млечне киселине) *in situ*. На крају поменутог пододељка објашњен је поступак испитивања органолептичких својстава и одређивања сензорно најприхватљивијих варијанти маринирања („Сензорна анализа природних производа у одабраном матриксу хране“).

У одељку „Методе које обухватају гајење хуманих ћелија у култури“ најпре су описани поступци одмрзавања замрзнутих ћелија и њиховог гајења, трипсинизације ћелијских култура, одређивања броја ћелија бојењем трипан плавим, као и поступак криопрезервације ћелија. У пододељку „Испитивање цитотоксичне активности биљних деривата *in vitro*“ описан је МТТ тест примењен за детекцију ефекта етарског уља и PDO, као и одабраних позитивних контрола – цитостатика доксорубицина (DOX) и 5-флуороурацила (5-FU), на одабране ћелијске линије и то: A549 (аденокарцином плућа), HT-29 и HCT116 (ћелије колоректалног аденокарцинома) и MRC-5 (нормални фибробласти плућа). Додатно је приказана и упоредна анализа токсичности тест супстанци на канцерским и нормалним ћелијама, тј. рачунање индекса селективне токсичности према канцерским ћелијама. У пододељку „Испитивање цитотоксичног ефекта два агенса у комбинацији“ најпре је приказана модификована МТТ метода, примењена за тестирање цитотоксичности бинарних комбинација деривата клеке и DOX на A549 и MRC-5 ћелијама, а затим и анализа типа

интеракције тест супстанци рачунањем вредности комбинаторног индекса и применом методе изоболограма. Пододељак „Цитометријска анализа ћелија у култури“ описује припрему суспензије ћелија за цитометријске анализе, као и поступке одређивања типа ћелијске смрти и дистрибуције ћелија по фазама ћелијског циклуса. Припрема суспензије ћелија и процедура алкалног комет теста приказани су у пододељку „Испитивање генотоксичног потенцијала применом комет теста“.

Одељак „Методe за испитивање интеракције микророганизама и ћелија гајених у култури и упоредну анализу антимикуробног и цитотоксичног потенцијала” садржи два пододељка; у првом су приказане методе за испитивање способности адхезије микроорганизама на хумане ћелије у култури (две варијате теста: пре-третман микроорганизама и ко-третман микроорганизама и сисарских ћелија), а у другом је наведена формула која омогућава упоредну анализу антимикуробног ефекта и цитотоксичности на хуманим ћелијама, тј. израчунавање индекса селективности антимикуробног агенса.

На крају поглавља Материјал и методе налази се одељак „Статистичке анализе“ у коме су наведени програми коришћени за статистичку обраду добијених резултата.

Поглавље **Резултати** подељено је у три потпоглавља: 1) хемијска карактеризација тест супстанци и њихова антиоксидативна активност, 2) цитотоксична активност деривата *J. communis* var. *saxatilis in vitro* и 3) антимикуробни потенцијал деривата клеке. Најпре су приказани резултати хемијске анализе свих етарских уља: оног добијеног хидродестилацијом *J. communis* var. *saxatilis* (Jc-EU-P), комерцијално набављеног уља клеке (Jc-EU-K) и чубра (Sm-EU). Садржај терпенских једињења, идентификованих методом гасне хроматографије са масеном спектрометријом, табеларно је приказана у одељку „Хемијски састав етарских уља“. Следи одељак који приказује резултате хемијске анализе PDO, вршене применом течне хроматографије са тандемском масеном спектрометријом, која је омогућила квантификацију одабраних фенолних једињења (флавоноиди, фенолне киселине, кумарини и лигнани) и хинске киселине. Осим табеларног приказа LC-MS/MS анализе, дат је и укупан садржај флавоноида у PDO. Даље су приказани резултати антиоксидативних тестова (DPPH и TBA), који истичу бољу антиоксидантну активност PDO, што је додатно потвђено и FRAP тестом (одељак „Антиоксидативни потенцијал деривата *J. communis* var. *saxatilis*“).

У оквиру другог потпоглавља прво су приказани резултати анализе цитотоксичне активности појединачно примењених деривата клеке (Jc-EU-P и PDO) и одабраних цитостатика (DOX и 5-FU) на различитим хуманим ћелијским линијама (A549, HT-29, HCT116 и MRC-5). Резултати су показали да су Jc-EU-P и PDO индуковали цитотоксичност према свим ћелијским линијама на дозно-зависан начин, с тим да је уље показало значајно већу цитотоксичност од PDO, што је нарочито било изражено у A549 ћелијама. Од свих

испитиваних канцерских линија А549 је била најосетљивија, док је најрезистентнија била НСТ116. Резултати су представљени кривама преживљавања на основу којих су израчунате  $IC_{50}$  вредности. Упоредна анализа ефеката на канцерским и нормалним ћелијама (анализа индекса селективности према канцерским ћелијама) показала је селективност PDO у случају А549 и НТ-29 ћелија (одељак „Цитотоксична активност појединачних тест супстанци“).

На основу резултата испитивања цитотоксичности појединачних агенаса одабране су канцерска А549 и нормална MRC-5 ћелијска линија за испитивање ефекта бинарних комбинација деривата клеке са DOX или међусобно комбинованих. Резултати су приказани у потпоглављу „Цитотоксична активност две тест супстанце у комбинацији“. На основу одређених  $IC_{50}$  вредности комбинација показано је да су биљни деривати примењени у нетоксичним дозама за нормалне ћелије сензибилисали и значајно повећали осетљивост канцерских ћелија према DOX. Осим тога, уочен је јачи ефекат деривата клеке у комбинацији, него када је сваки примењен појединачно. Синергистички ефекат је детектован у обе ћелијске линије у свим испитиваним комбинацијама, али је био израженији у канцерским А549, него у нормалним MRC-5 ћелијама.

У одељку „Ефекат деривата клеке на апоптозу и заустављање ћелијског циклуса“ приказани су резултати цитометријске анализе који су показали да PDO индукује рану и касну апоптозу А549 ћелија и доводи до застоја ћелијског циклуса у  $G_2/M$  фази, док ефекат етарског уља на ћелијски циклус и тип ћелијске смрти није био значајан. У одељку „Генотоксичност тест супстанци“ представљени су резултати алкалног комет теста који су показали да је само PDO довео до значајног повећања нивоа оштећења молекула ДНК у MRC-5 и нарочито А549 ћелијама.

У оквиру трећег целине поглавља Резултати (потпоглавље „Антимикробни потенцијал деривата клеке“), најпре су приказани резултати испитивања антимикробне активности појединачно примењених деривата клеке (Јс-EU-P и PDO) и антибиотика/антимикотика према одабраним бактеријама и гљивама (МИК тест), а након тога и ефекти бинарних комбинација деривата клеке са одабраним конвенционалним антимикробним агенсима (метода шаховске табле). Резултати МИК теста су интерпретирани преко минималних инхибиторних и минималних бактерицидних/фунгицидних концентрација које су табеларно приказане у одељку „Антифунгални и антибактеријски ефекат појединачно примењених тест супстанци“. Добијени резултати генерално су указали на бољи антимикробни ефекат PDO у поређењу са етарским уљем. Најосетљивија бактерија била је *Listeria monocytogenes*, док је међу испитиваним микромицетама најосетљивија била *Aspergillus versicolor*. За даља истраживања ефекта комбинација биљних деривата и конвенционалних антибиотика/антимикотика одабране су *L. monocytogenes* и *Candida*



*albicans*, на којима је испитан комбиновани ефекат етарског уља/PDO са антибиотцима (стрептомицином, ампицилином и азитромицином), односно антимицотиком бифоназолом. Добијени резултати, анализирани у одељку „Антимикробни потенцијал комбинације деривата клеке и антибиотика/антимицотика“, показали су да је у одређеним комбинацијама етарског уља и стрептомицина/ампицилина остварен синергизам, док је исти ефекат постигнут у одређеним комбинацијама PDO и свих испитиваних антибиотика. Синергизам је показан и за одређене комбинације бифоназола и PDO, када је тест организам била *C. albicans*.

Селективна токсичност деривата клеке према микроорганизмима, изражена преко индекса селективности ( $SI_M$ ), табеларно је приказана у одељку „Селективни антимицробни ефекат деривата клеке“. Резултати су показали јасну селективност PDO према *L. monocytogenes* као и према већини микромицета. Тестом адхезивности показано је да PDO значајно инхибира адхезију *L. monocytogenes* на ћелијске линије колона нарочито у случају НСТ116 ћелија, док је ефекат уља био занемарљив. Насупрот овоме, резултати добијени у случају *C. albicans* истичу висок потенцијал Јс-EU-P да инхибира процес адхезије на НТ-29 ћелије, док PDO исти стимулише (одељак „Ефекат деривата клеке на адхезију патогена *in vitro*“).

Резултати завршне фазе истраживања представљени су у одељку „Антимицробни потенцијал клеке у прехранбеним производима“. Он обухвата испитивање и анализу антимицробног ефекта етарског уља клеке у *in vitro* условима, као и у одабраном прехранбеном производу, у овом случају јунећем месу. У овој фази истраживања тестирано је комерцијално набављено етарско уље клеке (Јс-EU-K), као и уље чубра (Sm-EU), коришћено као позитивна контрола. Као модел организам одабрана је *L. monocytogenes* (референтни сој АТСС 19111 и примоиолати из хране и објекта за њену прераду LMB, LMS и LMT). Пододељак „Антилистеријални ефекат етарских уља и тип интеракције у бинарним комбинацијама“ показује да је антилистеријални ефекат оба уља у МИК тесту међусобно упоредив, те да је метода шаховске табле указала на синергизам у случају бинарних комбинација уља на свим примоиолатима, док је остварени ефекат у референтном соју углавном био индиферентан. Пододељак „Анализа сензорне прихватљивости“ приказује које су концентрације/комбинације уља биле сензорно најприхватљивије и омогућава, заједно са резултатима методе шаховске табле, да се одаберу максималне концентрације тест супстанци за даљу анализу (0,25 % за уље клеке, 0,125 % за уље чубра и 0,25 % клеке + 0,125 % чубра за њихову комбинацију; концентрације означене као инхибиторне). У пододељку „Динамика инхибиције раста сојева *L. monocytogenes*“, приказана је динамика преживљавања *L. monocytogenes* (АТСС 19111 и изолат са трупа говечета LMB) у присуству различитих

концентрација оба уља, примењена појединачно и у комбинацијама, у инхибиторним и серији суб-инхибиторних концентрација/комбинација. Подаци добијени у *Time kill* есеју интерпретирани су на два различита начина. Први је потврдио постојање синергизма у бинарним комбинацијама уља примењеним на изолату LMB, а други је омогућио процену динамичких МИК вредности и указао на значајно већу осетљивост бактерија у условима *Time kill* теста, него у микродилуционом МИК тесту.

Резултати испитивања ефекта различитих винских маринада (са или без етарског уља Јс-EU-K, Sm-EU, односно њихових комбинација) на динамику раста бактерија на јунећем месу *in situ*, представљени су графички у подељку „Антибактеријски ефекат винских маринада са етарским уљима“. Праћен је ефекат на раст инокулисане *L. monocytogenes* (сојеви LMB и АТСС 19111), али и на нормалну микрофлору меса, тј. укупан број аеробних хетеротрофних мезофила, ентеробактерија и бактерија млечне киселине. Добијени резултати су показали да све маринаде, а нарочито оне које садрже једно од уља или њихову комбинацију, поседују антибактеријски потенцијал.

У поглављу **Дискусија** дат је критички осврт уз детаљну анализу добијених резултата и поређење са резултатима других релевантних истраживања које је кандидаткиња користила током писања дисертације. Дискусија је подељена у неколико тематских целина. Најпре су истакнути проблеми узроковани све учесталијом појавом резистенције патогених бактерија према конвенционалним антибиотицима и ћелија канцера према цитостатицима, као и проблематика везана за употребу синтетичких конзерванаса и адитива у храни, а затим се наводе стратегије које могу представљати потенцијална решења ових проблема. Дискутован је хемијски састав етарских уља и PDO клеке, са освртом на њихов антиоксидативни ефекат као потенцијално важне карактеристике, а добијени резултати су упоређени са подацима из литературе. Будући да је карцином плућа један од најчешћих канцера са високом смртношћу и честим развојем резистенције на цитостатике, посебна пажња посвећена је анализи и тумачењу цитотоксичног потенцијала етарског уља и PDO управо према ћелијској линији аденокарцинома плућа А549. Резултати су повезивани са досадашњим сазнањима, са акцентом на резултатима проистеклим из ове дисертације, а тичу се механизма којима биљни агенси остварују цитотоксично деловање. Посебан допринос наших истраживања лежи у чињеници да је цитотоксични потенцијал PDO испитан по први пут. Дискутована је цитотоксичност DOX и нежељени ефекти његове употребе, па је затим истакнут значај комбиноване примене овог цитостатика и природних производа, са циљем побољшања ефикасности хемиотерапијских агенаса.

Ради добијања комплетније слике о биолошким активностима клеке испитана је и анализирана и антимикуробна активност њених деривата према контаминентима хране, те је и

овај сегмент истраживања опсежно дискутован. Уочени антимикуробни потенцијал представља значајан резултат који отвара могућности даљих истраживања. Добијени резултати су дискутовани у контексту доступне литературе која објашњава механизме антимикуробног деловања различитих етарских уља и екстраката, као и терпенских и фенолних једињења у њиховом саставу. Резултати антимикуробног потенцијала PDO су јединствени за ову дисертацију. Чињеница да биљни деривати клеке инхибирају адхезију *C. albicans* и *L. monocytogenes* на ћелије колоне значајна је и због тога што се клека већ користи у традиционалној медицини у лечењу болести гастроинтестиналног тракта. На крају, *in situ* антилистеријални потенцијал етарских уља на јунећем месу је детаљно дискутован, посебно због чињенице да је ово прво истраживање антимикуробног потенцијала деривата клеке у храни.

У поглављу **Закључци** приказано је 14 концизних закључака проистеклих из резултата ове докторске дисертације, који су изведени у складу са постављеним циљевима истраживања.

У поглављу **Литература** дата је листа од 326 актуелних литературних јединица које је кандидаткиња користила током израде докторске дисертације. Цитирани литературни извори покривају све наведене области у докторској дисертацији и адекватно су назначени у тексту.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Vasiljević, B.**, Knežević-Vukčević, J., Mitić-Ćulafić, D., Orčić, D., Francišković, M., Srdic-Rajic, T., Jovanović, M., Nikolić, B. (2018) Chemical characterization, antioxidant, genotoxic and *in vitro* cytotoxic activity assessment of *Juniperus communis* var. *saxatilis*. Food Chem. Tox. 112, 118-125; **M21a (IF: 3.977)**  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.044>
2. **Vasiljević, B.**, Mitić-Ćulafić, D., Djekic, I., Marković, T., Knežević-Vukčević, J., Tomasevic, I., Velebit, B., Nikolić, B. (2019) Antibacterial effect of *Juniperus communis* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* in vitro and in wine marinated beef. Food Control, 100, 247-256; **M21a (IF: 4.248)**  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.025>
3. Nikolić B., **Vasiljević B.**, Ćirić A., Mitić-Ćulafić D., Cvetković S., Džamić A., Knežević-Vukčević J. (2019) Bioactivity of *Juniperus communis* essential oil and post-distillation waste: Assessment of selective toxicity against food contaminants. Arch. Biol. Sci. 71, 235-244; **M23 (IF: 0.719)**  
<https://doi.org/10.2298/ABS181217005N>

### Б2. Саопштења са међународних скупова штампана у целини (M33)

1. Nikolić B., **Vasiljević B.**, Knežević-Vukčević J., Pavlović M., Mitić-Ćulafić D. (2018) Red wine marinades as a vehicle to control bacterial contamination on beef, 6th Workshop Specific Methods for Food Safety and Quality, Belgrade, Serbia, Proceedings, ISBN 978-86-7306-148-1, 167, P C6.
2. Nikolic, B., **Vasiljevic, B.**, Mitic-Culafic, D. (2019) Antilisterial effect of juniper (*Juniperus communis*) and its mixed application with winter savory (*Satureja montana*) in beef protection. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 333, No. 1, p. 012019). IOP Publishing.

### Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу (M34)

1. **Vasiljević, B.**, Paunkov, A., Knežević-Vukčević, J., Mitić-Ćulafić, D., Cvetković, S., Orčić, D., Francišković, M., Nikolić, B. (2017) Essential oil and postdistillation waste of *Juniperus communis* in biocontrol of opportunistic pathogen *Candida albicans*. 7th FEMS Congress of European Microbiologists, Valencia, Spain, e-Abstracts Book, FEMS7-1177.
2. **Vasiljević, B.**, Paunkov, A., Nikolić, B., Orčić, D., Francišković, M., Džamić, A., Mitić-Ćulafić, D., Knežević-Vukčević, J., Ćirić, A. (2017) Antifungal effect of *Juniperus communis* essential oil and postdistillation waste against selected micromycetes. 7th FEMS Congress of European Microbiologists, Valencia, Spain, e-Abstracts Book, FEMS7-1935.

3. Nikolić B., **Vasilijević B.**, Orčić D., Francišković M., Srđić-Rajić T., Mitić-Ćulafić D., Jovanović M., Knežević-Vukčević J. (2017) *Juniperus communis* essential oil and post-distillation waste improve doxorubicin cytotoxicity against lung cancer cells. 3rd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, Bansko, Bulgaria, Book of abstracts, ISBN: 978-619-7240-48-1, p. 266, PP-158.
4. **Vasilijević B.**, Paunkov, A. Nikolić, B., Cvetković, S., Džamić, A., Mitić-Ćulafić, D., Knežević-Vukčević, J., Ćirić, A. (2017) Antifungal effect of *Juniperus communis* essential oil and postdistillation waste against opportunistic pathogen *Candida albicans* and selected micromycetes. 10th Balkan Congress of Microbiology, Sofia, Bulgaria, e-Abstracts Book, p. 149, AntM-28.
5. Mitić-Ćulafić D., **Vasilijević B.**, Jovanović M., Knežević-Vukčević J., Djekic I., Cvetkovic S., Djukanovic S. and Nikolić B. (2019) Antibacterial potential of red-wine marinades containing essential oils against food contaminants in raw beef. 8<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, Glasgow, Scotland. e-Abstracts book, PW427.
6. Nikolić B., **Vasilijević B.**, Jovanović M., Knežević-Vukčević J., Djekic I., Cvetkovic S., Djukanovic S. and Mitić-Ćulafić D. (2019) *In vitro* antilisterial effect of essential oils by modeling of growth curve MIC values. 8<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, Glasgow, Scotland. e-Abstracts book, PW417.
7. Nikolić B., **Vasilijević B.**, Knežević-Vukčević J., Orčić D., Ćirić A.D., Džamić A., Anačkov G., Rajčević N., Mitić-Ćulafić D. (2019) New insights into biological potential of *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. From Stara Planina Mt: *in vitro* cytotoxic and antimicrobial effect. 13<sup>th</sup> Symposium on the flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions Stara Planina Mt., Serbia, Book of Abstracts, p. 167.

#### B4.Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64)

1. Cvetković S., **Vasilijević B.**, Mitić-Ćulafić D., Knežević-Vukčević J., Orčić D., Nikolić B. (2018) *Juniperus communis* essential oil and post-distillation waste: antibacterial effect against food contaminants and *in vitro* cytotoxicity against human colon cells. UNIFOOD Conference, Belgrade, Serbia. Book of abstracts, HZP1/FHP1.
2. Nikolić B., **Vasilijević B.**, Knežević-Vukčević J., Marković T., Djekic I., Velebit B., Mitić-Ćulafić D. (2018) Antilisterial activity of *Juniperus communis* and *Satureja montana* essential oils screened *in vitro*. UNIFOOD Conference, Belgrade, Serbia. Book of abstracts, HZP20/FHP20.
3. **Vasilijević B.**, Mitić-Ćulafić D., Knežević-Vukčević J., Djekic I., Tomasevic I., Nikolić B. (2018) Antibacterial activity of red-wine marinades containing *Juniperus communis* and *Satureja montana* essential oils against food contaminants in beef. UNIFOOD Conference, Belgrade, Serbia. Book of abstracts, OHP45/FCHP45.
4. Nikolić B., **Vasilijević B.**, Mitić-Ćulafić D., Marković T., Orčić D., Đekić I., Knežević-Vukčević J. (2018) Antibakterijski efekat kleke (*Juniperus communis* L.) i njena

## Провера оригиналности докторске дисертације

Извештај провере оригиналности докторске дисертације Бојане П. Василијевић, добијен коришћењем програма iThenticate у Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“ у Београду, показао је индекс сличности од 12 %. Увидом у Извештај утврђено је да су подударња углавном последица претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, личних имена и библиографских података о коришћеној литератури. Додатно, одређени делови текста код којих је утврђено подударање нису повезани и немају смисао. Извештај провере оригиналности докторске дисертације Бојане П. Василијевић указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидаткиње Бојане П. Василијевић, под насловом „**Хемијска карактеризација, антимикуробна и цитотоксична активност етарског уља и постдестилационог остатка клеке (*Juniperus communis* L.) и њихово комбиновано деловање са конвенционалним антибиотицима и цитостатицима**“, представља оригиналан научно-истраживачки рад који се бави испитивањем биолошких активности деривата клеке са потенцијалном применом у лечењу бактеријских и гљивичних инфекција и канцерских обољења, као и могућношћу примене уља *J. communis* у конзервирању хране.

Добијени резултати допринели су бољем разумевању антимикуробног потенцијала деривата клеке према одабраним микроорганизмима и цитотоксичног потенцијала, пре свега према ћелијама аденокарцинома плућа, са посебним освртом на њихову комбиновану примену са конвенционалним антимикуробним и антиканцерским агенсима. Уз то, они додатно препоручују етарско уље клеке у форми природног конзерванса.

Дисертација се одликује јасно дефинисаним циљевима, адекватним методама, концизним резултатима проистеклим из успешно реализованих експеримената и дискусијом која отвара могућности за даља истраживања, којима се кандидаткиња може бавити у будућности. Остварени резултати објављени су у оквиру три оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације **Бојане П. Василијевић**, под насловом „**Хемијска карактеризација, антимикробна и цитотоксична активност етарског уља и постдестилационог остатка клеке (*Juniperus communis* L.) и њихово комбиновано деловање са конвенционалним антибиотицима и цитостатицима**“, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри јавну усмену одбрану докторске дисертације кандидата **Бојане П. Василијевић**.

У Београду, 17.12.2020. године

## КОМИСИЈА

---

др Биљана Николић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

др Јелена Кнежевић-Вукчевић, редовни професор у  
пензији, Универзитет у Београду – Биолошки  
факултет

---

др Драгана Митић-Ђулафић, виши научни  
сарадник, Универзитет у Београду – Биолошки  
факултет

---

др Дејан Орчић, ванредни професор, Универзитет у  
Новом Саду, Природно-математички факултет

---

др Татјана Срдић-Рајић, научни саветник,  
Институт за онкологију и радиологију Србије