

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

На VI редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 15.05.2020. године, прихваћен је извештај ментора др Драгане Митић Тулафић о урађеној докторској дисертацији Марине И. Јовановић, истраживача сарадника, Института за општу и физичку хемију у Београду под насловом: „**Антимикробни и цитотоксични потенцијал етанолних екстраката одабраних представника подфамилије Polygonoideae и њихов ефекат у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Драгана Митић Тулафић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, ментор; др Биљана Николић, ванредни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет, члан; др Небојша Јаснић, ванредни професор-Универзитет у Београду, Биолошки факултет, члан; др Татјана Срдић Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд, члан; и др Емилија Свирчев, доцент, Универзитет у Новом Саду-Природно-математички факултет, члан.

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

**ИЗВЕШТАЈ**

**Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација Марине И. Јовановић под насловом „Антимикробни и цитотоксични потенцијал етанолних екстраката одабраних представника подфамилије Polygonoideae и њихов ефекат у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином“ представља истраживање које је проишло из вишегодишњег *in vitro* тестирања антимикробног и цитотоксичног потенцијала одабраних биљних екстраката подфамилије Polygonoideae, појединачно и у комбинацији са комерцијалним лековима, стрептомицином и

доксорубицином, са посебним освртом на *in vivo* испитивања безбедности примене самих екстраката.

Истраживање за ову докторску дисертацију рађено је на Катедри за микробиологију и Катедри за упоредну физиологију и екофизиологију, Биолошког факултета, Универзитета у Београду; Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине и Департману за физиологију животиња, Природно-математичког факултета у Новом Саду; део истраживања је спроведен у експерименталној лабораторији Института за онкологију и радиологију Србије; Институту за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ и Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду, Универзитет у Београду. Докторска дисертација реализована је у оквиру пројекта „Биолошки активни природни производи као потенцијални извор нових лекова и дијететских суплемената“ (ON-172058, руководилац др Мимица-Дукић Неда).

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о ментору и члановима комисије, Сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима, Списак скраћеница, Садржај, Текст по поглављима, Списак литературе и Прилоге.

Докторска дисертација је написана на 124 стране (проред 1), садржи 43 слике и 30 табела. Дисертација је подељена на осам поглавља: Увод (1-25 стране), Циљ истраживања (26. страна), Материјал и методе (27-43 стране), Резултати (44-84 стране), Дискусија (85-97 стране), Закључци (98-99 страна), Литература (100-114 стране) и Прилози (115-124 стране). Поред наведеног теза садржи и Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

## **Анализа докторске дисертације**

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи петнаест потпоглавља. Увод садржи значајне литературне податке који су непосредно повезани са темом докторске дисертације.

У потпоглављу „Употреба биљака и њихових деривата“ описан је кратак историјат тренда употребе биљака и њихових продуката у етнофармакологији и савременој фармацији. Такође је стављен акценат на значајност и заступљеност употребе биљних медикамената у данашњици. Назначено је да је етнофармаколошка употреба битна смерница приликом одабира биљних врста за *in vitro* и *in vivo* биолошка испитивања.

У потпоглављу „Подфамилија *Polygonoideae*“ су наведене заједничке карактеристике и таксономска класификација одабраних биљака подфамилије *Polygonoideae*, у које се убрајају: *Polygonum aviculare*, *Polygonum maritimum*, *Persicaria amphibia* (sin. *Polygonum*

*amphibium*), *Persicaria maculosa* (sin. *Polygonum persicaria*), *Persicaria lapathifolia* (sin. *Polygonum lapathifolium*), *Persicaria hydropiper* (sin. *Polygonum hydropiper*), *Bistorta officinalis* (sin. *Polygonum bistorta*) i *Fagopyrum esculentum* (sin. *Polygonum fagopyrum*).

У потпоглављу „Примена одабраних врста из подфамилије *Polygonoideae*“ наведене су примене одабраних биљака у кулинарству, народној медицини и другим делатностима.

У потпоглављу „Хемијски састав одабраних представника подфамилије *Polygonoideae*“ истакнуто је присуство најзаступљенијих секундарних метаболита који улазе у састав биљака представника подфамилије *Polygonoideae*. Истакнуто је да различите студије указују на значајно присуство биљних фенола, нарочито флавоноида и фенолних киселина који испољавају различите биолошке активности попут антимикуробних, антиканцерских и антиоксидативних.

У потпоглављу „Опуртунистички патогени и контаминенти хране“ стављен је акценат на патогене бактерије и гљиве, узрочнике кварења хране и изазиваче инфекција код људи и животиња. Представљена је савремена класификација и дат је кратак опис следећих бактерија: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, врсте рода *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Listeria monocytogenes*, као и следећих родова микромицета: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* и *Fusarium*, које су продуценти микотоксина. Такође, истакнуто је која обољења изазивају наведени микроорганизми код људи.

У потпоглављу „Пигменти као фактори патогености“ истакнуто је да се успешност патогенезе многих микроорганизама везује за продукцију пигмената и да је продукција пигмената важан параметар идентификације микроорганизама који се користи у клиничкој микробиологији.

Потпоглавље „Биофилм“ садржи следеће одељке „Дефиниција и својства биофилма“, „Формирање биофилма“, „Деградација биофилма“ и „Комуникација бактерија у биофилму (QS сигнализација)“. У наведеним одељцима најпре је описан феномен формирања биофилмова, као значајног фактора вируленције. Процес формирања биофилмова састоји се из више фаза. Својства сваке од фаза (адхезије, матурације и дисперзије) су подробно описане. Додатно истакнут је значај покретљивости ројењем, још једног фактора вируленције, који је веома важан у фази дисперзије. Приликом описа биофилмова *P. aeruginosa* указано је на састав, структуру и значај матрикса биофилма. Назначено је да су биофилмови честа појава на медицинској опреми и опреми прехранбене индустрије. Посебан акценат је стављен на начине уништавања биофилмова. Потом су изложена најбитнија сазнања о међубактеријској комуникацији, начину на који је регулисана, при чему су наведени фактори вируленције који су под контролом овог процеса. Међубактеријска

комуникација врсте *P. aeruginosa* описана је као комплексна мрежа сигналних путева, састављена из четири међусобно повезана система. Даље је описана хемијска природа аутоиндуцера Грам негативе бактерије, *P. aeruginosa*.

У потпоглављу „Антимикробни агенси биљног порекла“ истакнуто је да биљни екстракти представљају комплексне мешавине разноврсних конституената, услед чега различитим механизмима могу да испољавају антимикробне ефекте. Побројани су најчешћи механизми антимикробног деловања.

У потпоглављу „Антиканцерски агенси природног порекла и принципи њиховог деловања“ наведени су најзначајнији проналасци цитостатика изворно биљног порекла. Надаље је истакнуто да биљни полифенолни конституенти услед њихове комплексне хемијске структуре, могу реметити процесе малигне трансформације помоћу различитих механизма, при чему су назначени најзначајнији.

У потпоглављу „Доксорубицин“ описани су откриће, механизмима деловања и контраиндикације антрациклинског антибиотика доксорубицина (Д). Указано је на проблем развоја резистенције код канцерских ћелија и представљен је значај комбиноване терапије која укључује употребу биљних адјуванаса и комерцијалних цитостатика, попут Д.

У потпоглављу „Апоптоза“ истакнут је значај програмиране ћелијске смрти, апоптозе. Описане су карактеристике апоптотичних ћелија, главни апоптотски сигнални путеви који укључују митохондријални пут и каскаду рецептора смрти и представљена је детаљна разлика између апоптозе и некрозе. Акцент је стављен на генску регулацију митохондријалног сигналног пута и на активност каспаза.

У потпоглављу „Ћелијски циклус“ назначене су познате фазе ћелијског циклуса као и њихове контролне тачке, у којима се ревидира ћелијска деоба. Истакнуто је да је поремећај активности циклин зависних киназа, које су заслужне за несметано одвијање ћелијског циклуса, детектован у многим типовима малигних ћелија, укључујући и ћелије плућног и хепатоцелуларног карцинома.

У потпоглављу „Оксидативни стрес и антиоксидативна заштита“ наведени су неки од процеса у којима се продукују и акумулирају реактивне кисеоничне врсте (РОС) које доводе до стварања оксидативног стреса, дат је преглед врста најпотентнијих РОС молекула и описан је начин њихове неутрализације посредством антиоксидативних ензима. Посебна пажња је стављена на супероксид дисмутазе (СОД) и каталазу (КАТ). Представљене су три СОД изоформе: цитосолна, митохондријална и екстрацелуларна. Истакнуто је да биљне дроге и биолошки активне компоненте биљака могу активирати ензимске антиоксидативне системе, услед чега је тренд испитивања антиоксидативног ефекта биљних екстраката веома

заступљен. Указано је на постојање везе између нарушене равнотеже стварања РОС и њиховог неутралисања, као и настанака оксидативног стреса и канцера.

У потпоглављу „Регулација антиоксидативне заштите Keap1-Nrf2 сигналним путем“ подробно су описане три главне компоненте Keap1-Nrf2 сигналног пута, у које спадају: елементи антиоксидативног одговора, Nrf2 генски производи и Keap1 генски производи. Детаљно су описана два механизма, „шарка и реза“ и Cul3-Keap1 дисоцијација, којим Keap1 протеин репресор регулише активност Nrf2 протеина. Истакнуто је присуство конститутивне експресије Nrf2 гена праћено инактивацијом Keap1 репресора код различитих типова малигних ћелија. Наведени су процеси који доводе до конститутивне експресије Nrf2 гена.

У склопу потпоглавља „Безбедност примене биљних екстракта“ истакнут је проблем тровања биљкама и дат је преглед литературе о безбедности примене одабраних биљака подфамилије Polygonoideae у хуманој и анималној исхрани и медицини. Представљене су погодности спровођења *in vivo* експеримената на моделу *Danio rerio* приликом изучавања токсичности биљних екстраката.

У поглављу **Циљ истраживања** наведени су следећи основни циљеви истраживања:

- 1) анализа антимикуробног ефекта изабраних екстраката подфамилије Polygonoideae према одабраним гљивама и бактеријама, изазивачима инфекција,
- 2) анализа цитотоксичне активности одабраних екстраката појединачно и у комбинацији са конвенционалним цитостатиком Д,
- 3) испитивање улоге одабраних биљних екстраката у одговору ћелија на оксидативни стрес,
- 4) процена безбедности употребе селектованих биљних екстраката.

Да би се реализовали главни циљеви, дефинисани су и бројни конкретни подциљеви, који укључују испитивања:

- антифунгалног ефекта на гљиве, биљне и хумане патогене,
- антибактеријског ефекта екстраката на одабране сојеве бактерија изазивача болести код људи,
- ефекта екстраката на формирање биофилма, као и на већ формиран биофилм,
- ефекта екстраката на међубактеријску комуникацију (QS) у биофилму, праћењем ефекта екстраката на транскрипционе регулаторе QS,
- комбинованог ефекта биљних екстраката и антибиотика стрептомицина (Стр) на изабраним бактеријским сојевима,
- метаболичке активности третираних ћелија МТТ тестом,

- типа интеракција биљних екстраката и цитостатика Д у комбинацији, које се карактеришу математичком проценом индекса интеракције комбинованог ефекта,
- ефекта екстраката и цитостатика Д, појединачно и у комбинацији, на апоптозу и заустављање ћелијског циклуса,
- утицаја екстраката на експресију ензима антиоксидативне заштите, супероксид дисмутазе 1 и 2 и каталазе,
- регулације експресије *Keap1* и *Nrf2* гена,
- токсичности биљних екстраката на моделу *Danio rerio*.

У поглављу **Материјал и методе** описани су материјал и методе који су коришћени у реализацији наведених циљева. Потпоглавље Материјал подељено је на девет одељака у којима су наведени: 1) биљни екстракти херби (h) и ризома (r), чије су тачне ознаке наведене у заградама, добијени од следећих биљака: *Polygonum aviculare* (POAh, POAr), *Polygonum maritimum* (POMh), *Persicaria amphibia* (PEAh), *Persicaria maculosa* (PEMh), *Persicaria lapathifolia* (PELh; PELr), *Persicaria hydropiper* (PENh; PENr), *Bistorta officinalis* (BIOh; BIOr) и *Fagopyrum esculentum* (FAEh) 2) сојеви микроорганизама, 3) ћелијске културе, 4) микробиолошке подлоге и раствори потребни за рад са микроорганизмима, 5) подлоге и реагенси коришћени за гајење хуманих ћелија, 6) цитостатик који је коришћен у третману хуманих ћелија, 7) антибиотик коришћен у третману микроорганизама 8) прајмери за qRT-PCR и 9) антитела која су употребљавана у имуноблоту.

Потпоглавље Метода подељено је на 18 одељака. У одељцима „Припрема микромицета” и „Процена инхибиције раста микромицета” описан је начин гајења следећих микромицета: *Penicillium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Alternaria alternata* и *Aspergillus* sp. као и протокол за спровођење теста испитивања антифунгалне активности селектованих биљних екстраката. Протокол се базира на одређивању зона инхибиције раста наведених микромицета које расту на одговарајућој подлози, у које се додаје екстракт чија се активност испитује. Надаље, праћене су морфолошке промене на спорама *Aspergillus* sp. бојењем бромтимол плавимим посредством конфокалне микроскопије („Праћење морфолошких промена спора гљива конфокалном микроскопијом“). У наредним одељцима су описане методе и тестови коришћени у циљу утврђивања антибактеријске и анти-вирулентне активности селектованих биљних екстраката и њихових активних конституената. Најпре је описано како су припремане бактерије („Припрема преконоћних бактеријских култура“ и „Припрема бактерија за микродилуционе тестове“). Прва описана метода је „Одређивање минималне инхибиторне и бактериоцидне концентрације“. Антибактеријски ефекат биљних екстраката

микродилуционом методом истражен је према одабраним Грам позитивним (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) и Грам негативним (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) бактеријским сојевима из ATCC колекције. На основу добијених резултата минималне инхибиторне концентрације (енг. minimal inhibitory concentrations, MIC) и минималне бактерицидне концентрације (енг. minimal bactericidal concentrations, MBC) најосетљивији бактеријски сојеви и најефикаснији екстракт су одабрани за тестирање комбинованог ефекта екстракта и комерцијалног антибиотика Стр, при чему је начин тестирања описан у одељку „Евалуација утицаја екстракта и Стр у комбинацији методом шаховске табле (енг. checkerboard assay)“.

Након тога је спроведена серија тестова за детекцију анти-вирулентног потенцијала најпре селектованих биљних екстраката, а потом и њихових активних конституената. Приликом испитивања анти-биофилм активности одабраних екстраката, коришћено је више методологија, да би се што приближније утврдио механизам деловања. Анти-биофилм тестови су описани у одељцима: „Процена утицаја екстраката на формирање биофилма“ и „Процена утицаја екстраката на већ формиран биофилм“. Следећи испитивани фактор вируленције је био продукција пигмената. У одељцима „Тест продукције виолацеина *Chromobacterium violaceum* CV026“ и „Тест продукције пиоцијанина“ праћена је продукција пигмената виолацеина и пиоцијанина код сојева *C. violaceum* CV026 и *P. aeruginosa* PA14 након третмана одабраним агенсима. Такође је праћена покретљивост бактерија, у одељку „Тест покретљивости *P. aeruginosa* PAO1“ унутар ког је описана метода за испитивање утицаја екстракта на ројење. У циљу откривања механизма деловања одабраних екстраката и њихових активних конституената описано је коришћење биосензорских сојева за анализу ефеката на различите сигналне путеве међубактеријске комуникације *P. aeruginosa* („Тест интерференције екстраката са QS сигналним путевима“). У склопу тог одељка описана је метода компетитивне инхибиције рецептора међубактеријске комуникације.

У склопу одељка „Припрема културе хуманих ћелија“ и „Пасажирање културе хуманих ћелија“ дат је опис начина рада са културама хуманих ћелија, са акцентом на процес одржавања ћелија, који претходи експерименталном раду. Одређивање броја ћелија вршено је директним бројањем на хемоцитометру, након бојења трипан плавим, што је истакнуто у одељку „Процена броја вијабилних ћелија“.

Одељци „Испитивање цитотоксичне активности *in vitro*“ и „Утврђивање типа интеракције тест супстанци у комбинацији на одабраним ћелијским линијама“ односе се на испитивања цитотоксичног потенцијала одабраних биљних екстраката, као и комбинације екстраката и

цитостатика Д, на ћелијским линијама канцера јетре (HepG2) и плућа (A549), као и на нормалним фибробластима плућа (MRC-5), посредством МТТ теста, при чему су одређиване: полулеталне дозе (inhibition concentration, IC<sub>50</sub>), дозе којом се постиже инхибиција вијабилности ћелија за 25% (IC<sub>25</sub>) и типови интеракција у комбинованом третману биљним екстрактима и цитостатиком. Типови интеракција у комбинованим третманима су окарактерисани комбинованим индексом (CI) и описани као синергизам (CI<1), адитивност (CI=1) или антагонизам (CI>1). Надаље, одређивање механизма цитототоксичности на ћелијском нивоу, вршено је методама проточне цитометрије. Испитан је про- и антиапоптоски потенцијал биљних екстраката и Д, појединачно и у комбинацији, као и њихов утицај на ремећење ћелијског циклуса како канцерских тако и нормалних ћелија (одељци „Проточна цитометрија“, „Припрема ћелија за испитивање типа ћелијске смрти и анализе ћелијског циклуса“, „Одређивање типа ћелијске смрти“ и „Испитивање дистрибуције ћелија по фазама ћелијског циклуса“). Ниво антиоксидативних ензима, супероксид-дисмутаза 1 и 2 и каталазе у канцерским ћелијским линијама, HepG2 и A549, и здравој MRC-5 ћелијској линији праћен је применом имуноблот технике. Детаљани протоколи припреме ћелијских лизата и одређивање концентрације укупних протеина спектрофотометријском методом по Лорију, односно тестови који су претходили имуноблоту, описани су у одељку „Испитивање утицаја и механизма деловања тестираних екстраката на продукцију антиоксидативних ензима у хуманим ћелијама *in vitro*“ и додатним одељцима „Припрема ћелијских лизата“ и „Одређивање концентрације укупних протеина методом по Лорију (енг. Lowry)“.

Детаљан протокол имуноблот методе: денатурације протеина, раздвајања протеина по величини помоћу СДС полиакриламид гел електрофорезе, мокри трансфер протеина са гела на мембрану, блокирање мембране, примарна антитета и детекција сигнала са мембране у комори за детекцију описани су у одељку „Испитивање активности антиоксидативних ензима имуноблот техником“.

У завршном делу групе експеримената која је спроведена на хуманим ћелијским линијама, са сврхом испитивања потенцијалних Nrf-2 инхибитора праћена је експресија гена Nrf-2 и Keap1 qRT-PCR методом (одељак „Испитивање регулације генске експресије qRT-PCR методом“).

Одељак „Процена токсичности екстраката на ембрионалном моделу зебрица (*Danio rerio*)“, се састоји од два пододељка „Услови узгоја *Danio rerio*“ и „Евалуација токсичности“ у којима је описана метода процене токсичности одабраних екстраката и њихових доминантних конституената на ембрионалном моделу *Danio rerio*, као и сам узгој ембриона.



На крају поглавља Материјал и методе, налази се одељак „Статистичка анализа“, коришћена у анализи резултата.

Поглавље **Резултати** укључује две велике целине: 1) Антимикробни ефекти одабраних екстраката и 2) Ефекат РОАh, РОМh, РЕАh и РЕМh екстраката и њихова интеракција са Д на хуманим ћелијама различитих карцинома у *in vitro* условима. Додатно, на крају овог поглавља налази се одељак „Процена токсичности екстракта на ембрионалном моделу зебрица (*Danio rerio*)“.

У првом потпоглављу Резултата приказани су резултати испитивања антифунгалног (Антифунгални ефекти одабраних екстраката) и антибактеријског ефекта (Антибактеријски ефекти одабраних биљних екстраката) одабраних етанолних екстраката подфамилије *Polygonoideae*. У почетним скрининг тестовима анализирано је 12 екстраката, а у зависности од добијених резултата бирани су екстракти са најефикаснијим деловањем за даља тестирања.

У одељцима „Процена инхибиције раста микромицета након третмана одабраним екстрактима“ и „Праћење морфолошких промена спора гљива конфокалном микроскопијом“ истакнуто је да сви тестирани биљни екстракти показују умерени антифунгални ефекат. Ни један од 12 екстраката није стимулисао раст тестираних гљива (*A. alternata*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *F. semitectum* и *F. oxysporum*). Као најрезистентнија гљива на дејство екстраката је препозната *F. oxysporum*, према којој је донекле значајан ефекат инхибиције остварио једино екстракт хербе *Persicaria maculosa* (16,54%). Са друге стране, максимална инхибиција раста (34,76%) остварена је применом екстракта ризома *Persicaria hydropiper* (2 mg/mL) према гљиви *A. alternata*. Поједини екстракти доводили су до деколоризације конидија и промене морфологије спора гљиве *Aspergillus sp.*

Надаље су приказани резултати серије тестова који су спроведени у циљу изучавања антибактеријског ефекта. У оквиру одељка „Одређивање минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације одабраних екстраката микродилуционим есејима“ истакнуто је да тестиране Грам-негативне бактерије показују слабију осетљивост према одабраним екстрактима, док је најосетљивија Грам позитивна бактерија била *Staphylococcus aureus* АТСС 25923. Према Грам негативним бактеријама: *E. coli* АТСС 8739, *S. Enteritidis* АТСС 13076, *P. aeruginosa* АТСС 15442, *S. flexneri* АТСС 9199, поједини екстракти су испољили антибактеријски ефекат, али је он занемарљиви услед високих концентрација (МИК $\geq$ 2,5 mg/mL). Као најосетљивија детектована је Грам позитивна бактерија *S. aureus* АТСС 25923. Екстракти ризома *Polygonum aviculare* као и хербе *Bistorta officinalis* показали су бактериостатски ефекат према *S. aureus* АТСС 25923 при концентрацији од 0,312 mg/mL и бактерицидни при концентрацији од 0,625 mg/mL. Екстракт ризома *Bistorta officinalis* изазвао

је бактериостатски ефект према *S. aureus* на концентрацији од 0,156 mg/mL, односно бактерицидни на концентрацији од 0,312 mg/mL. Следећи значајан резултат који је представљен указује да екстракт ризома *Bistorta officinalis* ступа у различите врсте интеракција са стрептомицином, укључујући и синергистички ефекат остварен према *S. aureus* („Комбиновани ефекат ВІОг екстракта и комерцијалног антибиотика Стр“).

Даље у одељку „Антибиофилм и антивирулентна активност биљних екстраката“ описан је утицај екстраката на активности које су регулисане QS међубактеријском комуникацијом. Овај одељак обухвата пет подналова „Производња виолацеина *C. violaceum* CV026 након третмана са одабраним екстрактима“, „Ефекат екстракта РЕМh и ВІОг на формирање биофилма сојева *S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 и *P. aeruginosa* PAO1“, „Ефекат екстракта ВІОг на редукцију броја бактерија у преформираној биофилм заједници сојева *S. aureus* ATCC 25923 и *S. Enteritidis* ATCC 13076“, „Ефекат РЕМh и ВІОг екстракта на производњу пиоцијанина *P. aeruginosa* PA14“, „Ефекат екстракта РЕМh и ВІОг на покретљивост *P. aeruginosa* PAO1“, „Утицај РЕМh и ВІОг екстраката на QS међубактеријску комуникацију“. Утицај доминантних конституената екстраката је посебно истакнут у засебним одељцима („Ефекат доминантних конституената екстракта на формирање биофилма соја *P. aeruginosa* PAO1“, „Производња виолацеина *C. violaceum* CV026 након третмана са доминантним конституентима екстраката“, „Ефекат доминантних конституената екстракта на формирање биофилма соја *P. aeruginosa* PAO1“, „Утицај доминантних конституената екстраката на QS међубактеријску комуникацију“). Најбитнији резултати потврђују да екстракти хербе *Persicaria maculosa* и ризома *Bistorta officinalis* имају утицај на формирање биофилма сојева *S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 и *P. aeruginosa* PAO1 при чему се јављају оба ефекта и стимулаторни и инхибиторни у зависности од генетичких карактеристика бактерија као и тестираних концентрација екстраката. Такође, екстракт ризома *Bistorta officinalis* остварује дуални ефекат на преформирани зрели биофилм соја *S. Enteritidis* ATCC 13076, при чему у зависности од тестиране концентрације екстракт редукује или повећава преживљавање бактерија у зрелом биофилму. Са друге стране, екстракт ризома *Bistorta officinalis* искључиво смањује преживљавање бактерија зрелог биофилма соја *S. aureus* ATCC 25923. До инхибиције синтезе виолацеина доводе екстракти херби *Persicaria amphibia*, *Persicaria maculosa* и *Bistorta officinalis*, екстракти ризома *Polygonum aviculare* и *Bistorta officinalis* као и њихови активни конституенти хинска киселина, хлорогенска киселина, катехин и кверцетин-3-О-глукозид. Утицај екстраката хербе *Persicaria maculosa* и ризома *Bistorta officinalis* на факторе вируленције: мобилност, производњу пигмената и формирање биофилма *Pseudomonas aeruginosa* је у корелацији са смањењем активности LasR рецептора сигналног пута међубактеријске комуникације.

Појединачни конституенти тестираних екстраката, катехин и кверцетин-3-*O*-глукозид такође утичу на Las сигнални пут, инхибирањем LasR рецепторне активности.

Следећи део Резултата базира се на биолошким активностима четири одабрана екстракта херби: *Polygonum aviculare*, *Polygonum maritimum*, *Persicaria amphibia* и *Persicaria maculosa*, на хуманим ћелијским линијама. Прво је представљена цитотоксична активност наведених екстраката, индивидуално и у комбинацији са комерцијалним цитостатиком доксорубицином, на HepG2, A549 и MRC-5 ћелијским линијама („Цитотоксична активност биљних екстраката појединачно и у комбинацији са Д *in vitro*“). Екстракти херби *Polygonum aviculare*, *Persicaria maculosa* и *Persicaria amphibia* показали су цитотоксичност према ћелијским линијама хепатокарцинома (HepG2), аденокарцинома (A549) и нормалним фибробластима (MRC-5) плућа.

Испитивање ефекта екстраката у комбинацији са комерцијалним цитостатиком Д указало је на постојање сва три типа интеракције, при чему је најбољу селективност показао екстракт хербе *P. aviculare*, за који је утврђен синергизам у случају канцерских, а антагонизам у нормалним ћелијама.

Потом је представљен утицај одабраних екстраката на увођење ћелија у апоптозу, заустављање ћелијског циклуса, моделовање активности антиоксидативних ензима и експресије *Keap1* и *Nrf2* гена („Анализе утицаја РОА<sub>h</sub>, РОМ<sub>h</sub>, РЕА<sub>h</sub> и РЕМ<sub>h</sub> екстраката проточном цитометријом“, „Утицај биљних екстраката на активност ензима антиоксидативне заштите“, „Утицај биљних екстраката на регулацију експресије *Nrf2* и *Keap1* гена“).

У овом делу дисертације описани су резултати који говоре о присуству проапоптотског ефекта и заустављању ћелијског циклуса у некој од фаза на свим ћелијским линијама у случају екстракта хербе *Persicaria maculosa*. Преостали испитани екстракти херби *Polygonum aviculare*, *Polygonum maritimum* и *Persicaria amphibia* остварују оба ефекта једино на HepG2 ћелијама. Истиче се да на свим ћелијским линијама екстракти појединачно или у комбинацији са Д најчешће доводе до смањења броја ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса, при чему долази до накупљања ћелија у G2/M или субG1 фазама ћелијског циклуса. Даље, приложен је опис графика којима су представљени резултати нивоа ензима антиоксидативне заштите и експресије *Keap-1* и *Nrf2* гена. Уочава се да тестирани екстракти испољавају различите ефекте на ензиме антиоксидативне заштите, супероксид дисмутазе и каталазу у различитим ћелијским линијама. Значајним се могу сматрати смањење активности ензима у канцерским HepG2 ћелијама изазвано деловањем свих екстраката изузев *Polygonum maritimum*, као и *Persicaria amphibia* примењене индивидуално и у комбинацији са Д у канцерским A549 ћелијама. Поред тога, значајно је и повећање активности антиоксидативних ензима у нормалним MRC-5 ћелијама, што је уочено у случају примене

екстраката херби *Polygonum aviculare* и *Persicaria maculosa*, појединачно и у комбинацији са доксорубицином. Као веома битан резултат издвојен је ефекат екстраката на регулацију Keap1- Nrf2 сигналног пута, а преко њега и на ниво ензима антиоксидастивне заштите. Ефекат је уочен у случајевима појединачне примене екстракта хербе *Polygonum aviculare*, и котретмана екстракта *Persicaria maculosa* и Д у HepG2 ћелијама; применом екстракта *Persicaria amphibia*, појединачно и у комбинацији са Д у A549 ћелијама.

У последњем делу Резултата описан је исход испитивања на *in vivo* ембрионалном моделу зебра- рибице *Danio rerio* при чеми је показано да екстракти ризома *Bistorta officinalis* и хербе *Persicaria maculosa* и њихови активни конституенти катехин и кверцетин-3-О-глукозид у дозама од 125 µg/mL, 50 µg/mL и 30 µg/mL не утичу на преживљавање и развој ембриона. Битно је истаћи одсуство токсичног и тератогеног ефекта ВІОг и РЕМh екстракта на *Danio rerio* при концентрацији од 50 µg/mL, за коју је утврђен антибиофилм ефекат. Наведено оправдава даља истраживања ВІОг и РЕМh екстракта у смеру потпуне искористивости њиховог анти-вирулентног потенцијала тј. употребе протов инфекција узрокованим са *P. aeruginosa*.

У поглављу **Дискусија** детаљно су анализирани добијени резултати и дат је критички осврт упоређујући их са резултатима других истраживања приказаним у наведеној литератури. Ово поглавље је подељено на четири потпоглавља: „Антимикробни ефекти“ „Цитотоксичност одабраних екстраката“ „Безбедност примене екстраката“ и „Даље перспективе истраживања одабраних представника подфамилије Polygonoideae базирана на представљеним резултатима дисертације“. Прво потпоглавље посвећено је антифунгалном, антибактеријском, антибиофим и анти-QS ефектима тестираних етанолних екстраката одабраних Polygonoideae биљака. У досадашњој литератури није тестиран анти-QS ефекат одабраних биљних екстраката, као ни антибактеријски ефекат одабраног биљног екстракта у комбинацији са стрептомицином, што указује на иновативност овог истраживања, као и велики потенцијал даљег истраживања и унапређивања употребе ових екстраката. У другом потпоглављу истакнут је потенцијал одабраних етанолних екстраката, *Polygonum aviculare* и *Persicaria amphibia* као адјуванаса хемиотерапеутику доксорубицину, који је први пут потврђен у овој дисертацији. У трећем потпоглављу наглашена је безбедност *in vivo* примене биљних екстраката хербе *Persicaria maculosa* и ризома *Bistorta officinalis* у антибиофилм анктивним концентрацијама. У четвртном потпоглављу предложени су даљи токови истраживања на основу доказаних потенцијала тестираних екстраката.

У поглављу **Закључци** изнето је 9 концизних закључака проистеклих из релевантних резултата рада ове докторске дисертације, а који су у складу са постављеним циљевима и задацима истраживања.

У поглављу **Литература** дата је листа 232 извора литературе. Сви цитирани литературни извори су актуелни и у складу са последњим научним открићима. Ови литературни подаци су омогућили лакше разумевање добијених резултата и олакшали дискусију. Наведени извори покривају све области обрађене у докторској дисертацији и адекватно су назначени у самом тексту.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

#### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

1. **Jovanović, M.**, Srdić-Rajić, T., Svirčev, E., Jasnić, N., Nikolić, B., Bojić, S., Stević, T., Knežević-Vukčević, J., Mitić-Ćulafić, D. (2018) Evaluation of anticancer and antimicrobial activities of the *Polygonum maritimum* ethanol extract. Archives of Biological Sciences 70(4), pp.665-673. **M23 (IF: 0,554)**  
<https://doi.org/10.2298/ABS180423028J>
2. **Jovanović, M.**, Morić, I., Nikolić, B., Pavić, A., Svirčev, E., Šenerović, L., Mitić-Ćulafić, D. (2020) Anti-Virulence Potential and In Vivo Toxicity of *Persicaria maculosa* and *Bistorta officinalis* Extracts. Molecules, 25(8), p.1811. **M22 (IF: 3,06)**  
<https://doi.org/10.3390/molecules25081811>

#### **Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. Mitić-Ćulafić D., **Jovanović M.**, Svirčev E., Srdić-Rajić T., Orčić D., Bojić S., Nikolić B., Jasnić N., Cvetković S., Knežević-Vukčević J. (2017) Biological activities of selected herb extracts of Polygonum and Persicaria species. 3rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf, Bansko, Bulgaria, Book of Abstracts, 260, PP153, ISBN 978-619-7240-48-1. **M34**
2. **Jovanović M.**, Tenji D., Jasnić N., Svirčev E., Knežević-Vukčević J., Nikolić B., Mitić-Ćulafić D. The modulation of Keap1-Nrf2 signaling pathway: *in vitro* studies of commercial cytostatic and Polygonoideae weeds with chemotherapeutic potentials. (2019) 6th Congress of the Serbian genetic society, Vrnjačka Banja, e-Abstracts Book, ISBN 978-86-87109-15-5, 119, 03-06. **M34**
3. **Jovanović M.**, Nikolić B., Morić I., Šenerović L., Pavić A., Svirčev E., Mitić-Ćulafić D. (2019) *In vitro* antibiofilm effect and cytotoxicity, and *in vivo* toxicity of *Persicaria maculosa* and *Bistorta officinalis* ethanolic extracts. 8th Congress of European Microbiologists, Glasgow, Scotland, Book of Abstract, PW043, p. 1173. **M34**

#### **Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја**

1. **Jovanović, M.**, Svirčev, E., Srdić-Rajić, T., Bojić, S., Nikolić, B., Jasnić, N., Stević, T., Knežević-Vukčević, J., Mitić-Ćulafić, D. (2018) Биолошка активност етанолног екстракта *Polygonum maritimum*. Други конгрес биолога Србије, Кладово, Србија, Књига саžетакa, p. 136. **M64**

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Марине И. Јовановић број индекса Б3016/2014, послата је на софтверску проверу оригиналности дана 30.01.2020. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио 31.01.2020. На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Антимикробни и цитотоксични потенцијал етанолних екстраката одабраних представника подфамилије Polygonoideae и њихов ефекат у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином” констатујемо да утврђено подударање текста износи 20 %. Овај степен подударности последица је цитата који укључују лична имена, латинска имена микроорганизама и библиографске податаке о коришћеној литератури, затим неких општих места и података пре свега у оквиру поднаслова „Материјали и методе“ где се наводе стриктно процедуре које су општеприхваћене (састав медијума, PCR и qPCR процедуре, списак прајмера итд.). Поред овога програм је као подударност означио и коришћење стандардних израза и кратких фраза уобичајених у енглеском језику. Овом степеном подударности делом доприносе и претходно публиковани резултати докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Марине И. Јовановић, под насловом „Антимикробни и цитотоксични потенцијал етанолних екстраката одабраних представника подфамилије Polygonoideae и њихов ефекат у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидата Марине И. Јовановић под насловом „Антимикробни и цитотоксични потенцијал етанолних екстраката одабраних представника подфамилије Polygonoideae и њихов ефекат у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином“ представља оригиналан научно-истраживачки рад који се бави испитивањем различитих биолошких ефеката и безбедности примене етанолних екстраката одабраних представника подфамилије Polygonoideae појединачно и у комбинацији са комерцијалним лековима, стрептомицином и доксорубицином.

Целокупни резултати овог истраживања допринели су бољем разумевању биолошких механизма преко којих одабрани етанолни екстракти, појединачно и у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином, остварују антимикробни односно цитотоксични ефекат.

Дисертација се одликује јасно дефинисаним циљевима, адекватним методама и успешно реализованим експериментима. Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску дисертацију, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску дисертацију и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидата Марине И. Јовановић и омогући кандидату јавну одбрану рада.

У Београду, 19.05.2020. године

**КОМИСИЈА:**



др Драгана Митић Тулафић, виши научни сарадник,  
Универзитет у Београду, Биолошки факултет



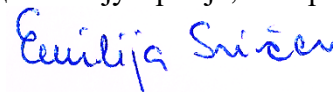
др Биљана Николић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду, Биолошки факултет



др Небојша Јаснић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду, Биолошки факултет



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



др Емилија Свирчев, доцент,  
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду