

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 08.04.2022. године, прихваћен је извештај ментора др Марине Соковић и др Немање Рајчевића о урађеној докторској дисертацији **Дејана С. Стојковића** истраживача сарадника Института за биолошка истраживања “Синиша Станковић”- Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, под насловом „**Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Ariaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae)**“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Ана Џамић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, др Данијела Дракулић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство и др Урош Гашић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”- Институт од националног значаја за Републику Србију.

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

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Дејана С. Стојковића** под називом “**Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Ariaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae)**“, написана је на 134 стране компјутерски обрађеног текста и садржи 37 слика (8 у поглављу Увод, 12 у поглављу Материјал и методе, 15 у поглављу Резултати и дискусија, 2 у поглављу Општа дискусија) и 22 табеле (2 у поглављу Увод, 18 у поглављу Резултати и дискусија, 2 у поглављу Општа дискусија). Основне целине ове дисертације су Увод (24 стране), Циљ (1 страна), Материјал и методе (18 страна), Резултати и дискусија (52 стране), Општа дискусија (5 страна), Закључци (2 стране), Литература (17 страна; 211 референци). Дисертација садржи и насловне странице на српском и енглеском језику (2 стране), страницу са информацијама о менторима и члановима комисије (1 страна), захвалницу (1 страна), сажетке на српском и енглеском језику (2 стране), листа извора слика (1 страна) и садржај (3 стране). У оквиру прилога

се налазе: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (5 страна).

Анализа докторске дисертације:

Предмет докторске дисертације кандидата Дејана С. Стојковића јесте анализа биолошког потенцијала и хемијска карактеризација метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Ariaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae).

У поглављу **УВОД** које садржи 4 тематске целине на систематичан начин су представљена досадашња сазнања из литературе која су битна за сагледавање теоретске основе проблематике докторске дисертације. У првој тематској целини представљена је класификација и морфолошке карактеристике испитиваних врста. У овом делу кандидат је представио досадашња сазнања о класификацији, макроморфолошким и хисто-анатомским карактеристикама испитиваних врста *Anthriscus cerefolium*, *Ononis spinosa* и *Phlomis fruticosa*. У другој тематској целини кандидат је описао етноботаничку употребу врста родова *Anthriscus*, *Ononis* и *Phlomis*. Овај део приказује традиционалну употребу врста родова *Anthriscus*, *Ononis* и *Phlomis* у свету код третмана различитих медицинских стања, као и у кулинарству, кроз историју до данашњих дана. У трећој тематској целини је на систематичан начин дат преглед антимикуробне, антиоксидативне и анти-инфламаторне активности врста родова *Anthriscus*, *Ononis* и *Phlomis*. Детаљно је описана потреба за открићем и развојем нових антибактеријских и антифунгалних агенаса због све чешће појаве резистентности микроорганизама на постојеће антимикуробне лекове. Такође, у овом делу је описан значај оксидативног стреса и употреба антиоксиданаса за људско здравље, као и употреба анти-инфламаторних агенаса код упалних процеса. У четвртој тематској целини описана су биолошки активна полифенолна једињења и приказана је повезаност биолошке активности испитиваних врста са са хемијским саставом биљака. Дат је кратак преглед структуре и класификације полифенола и приказано је њихово дејство у третману различитих обољења. Такође, анализирани су постојећи литературни подаци о хемијском саставу флавоноида код врста родова *Anthriscus*, *Ononis* и *Phlomis*.

У поглављу **ЦИЉЕВИ** су јасно дефинисани научни циљеви овог истраживања. Као основни циљ истраживања ове докторске дисертације је постављена упоредна анализа биолошких активности и хемијског састава метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm (Ariaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae), узимајући у обзир сличну примену испитиваних биљака у етноботаници. Како би се реализовао основни циљ истраживања дефинисани су специфични циљеви: анализа антибактеријског и антифунгалног дејства, одређивање потенцијалног механизма антимикуробног деловања, анализа антибиофилм активности,

анализа антиоксидативног потенцијала, одређивање инхибиторних концентрација метанолних екстраката проучаваних биљака за ензиме повезане са терапијом дијабетеса и неуродегенеративних обољења, анализа антипролиферативног потенцијала, анализа анти-инфламаторног потенцијала и идентификација и квантификација фенолних и сродних једињења употребом течне хроматографије високих перформанси у комбинацији са масеном спектрометријом.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** које обухвата четири тематске целине је написано прегледно са свим детаљима неопходним за репродуковање експерименталних процедура. Детаљно су приказане процедуре рада, као и материјал и инструменти коришћени у раду. У првој тематској целини је описан локалитет где су биљне врсте сакупљане, као и начин складиштења биљног материјала. У другој тематској целини је приказан прецизан начин екстракције биљног материјала, уз схематски приказ целокупне процедуре. У оквиру треће тематске целине детаљно су описане методе коришћене за анализу биолошког потенцијала метанолних екстраката испитиваних врста биљака и ова тематска целина је организована у више мањих целина: методе коришћене за испитивање антимикуробне активности екстраката, методе за испитивање антиоксидативне активности екстраката, као и методе за испитивање ензим-инхибиторне активности екстраката, антипролиферативног и анти-инфламаторног потенцијала екстраката. Приказане су стандардне методе за анализу антибактеријске и антифунгалне активности, као и сојеви микроорганизама који су коришћени у раду. Такође, детаљно су представљени тестови за испитивање ефеката екстраката на: способност формирања биофилма *Staphylococcus aureus* и продукцију стафилоксантина код овог соја, формиран биофилм врста рода *Candida* и на интегритет ћелијске мембране *C. albicans*, као и потенцијално дејство путем ергостерола. Антиоксидативне активности су анализиране коришћењем следећих тестова: DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, тест са фосфомолибдатом и тест способности хелирања јона метала. Ензим-инхибиторна активност екстраката је испитивана коришћењем метода за одређивање инхибиције следећих ензима: холинестеразе, амилазе, глукозидазе и тирозиназе. Такође, детаљно је приказан кристал-виолет тест који је коришћен за анализу антипролиферативног потенцијала екстраката и описане су ћелијске линије коришћене у раду (A172, SiHa, MCF7, HepG2, HaCaT, HGF1). Такође, детаљно је описана имунофлуоресцентна цитохемијска метода коришћена за анализу ефекта екстракта на морфологију ћелија глиобластома и експресију маркера пролиферације Ki67, као и метода употребљена за процену анти-инфламаторне активности екстраката. У оквиру четврте тематске целине приказан је материјал и методе коришћене за квалитативну и квантитативну хемијску анализу метанолних екстраката испитиваних врста биљака.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА**, организованом у 9 тематских целина, прегледно су представљени резултати истраживања ове докторске дисертације и упоређени са подацима из литературе. Резултати експеримената су документовани

табелама и сликама које су јасно објашњене у легендама. У првој тематској целини приказан је принос метанолних екстраката након екстракције. У другој тематској целини детаљно је анализирана антибактеријска активност метанолних екстраката и резултати су упоређени са стандардним антибиотицима (3 табеле) као и са подацима из литературе. У оквиру ове тематске целине представљени су и резултати анализе ефеката екстраката на формирање биофилма бактерије *Staphylococcus aureus* (1 табела) и на продукцију стафилоксантина код *S. aureus* (1 слика). У трећој тематској целини приказани су резултати анализе антифунгалне активности екстраката (3 табеле) и подаци из литературе који указују на антифунгални потенцијал испитаваних биљака, као и резултати анализе утицаја екстраката на формиран биофилм *Candida* сојева (1 табела) и на интегритет ћелијске мембране *C. albicans* (1 слика). Такође у оквиру ове тематске целине представљен је и резултат анализе да ли екстракти остварују антифунгални ефекат нарушавањем биосинтетског пута ергостерола (1 слика). У оквиру четврте тематске целине приказани су резултати анализе антиоксидативне активности метанолних екстраката и резултати шест различитих тестова су сумирани на једној слици и у једној табели. Такође, добијени резултати су упоређени са подацима из литературе о антиоксидативној активности екстраката анализираних биљака. У петој тематској целини кандидат је представио резултате анализе ензим-инхибиторне активности екстраката са табеларним и графичким приказом резултата (1 слика и 1 табела) и упоредио добијене резултате са литературним подацима. Наредна, шеста тематска целина обухвата резултате анализе антипролиферативне активности екстраката тестиране на не-туморским и туморским ћелијским линијама (1 табела) као и литературне податке о антипролиферативном потенцијалу екстраката тестираних биљака. У оквиру ове тематске целине приказани су и резултати анализе ефеката екстраката на морфологију ћелија глиобластома и на експресију маркера пролиферације Ki67 (5 слика). У седмој тематској целини су представљени резултати антиинфламаторне активности екстраката (1 табела). Осма и девета тематска целина садрже резултате квалитативне и квантитативне хемијске анализе метанолних екстраката, редом, где је приказан хемијски профил метанолних екстраката (3 табеле) и количина идентификованих једињења присутних у њима (3 табеле). Додатно у осмој тематској целини су представљени и предложени путеви фрагментације неких једињења која су идентификована (3 слике). У деветој тематској целини је приказана и структура доминантног једињења у екстракту *A. cerefolium* (1 слика) и хроматограм екстракта *O. spinosa* (1 слика).

Кандидат је дискутовао добијене резултате у свакој од наведених тематских целина. У тематским целинама је поред резултата за сваку испитивану биљну врсту, дат и компаративни преглед биолошке активности екстраката и означен екстракт који је испољио најбољу активност у сваком тесту понаособ. Резултати добијени прегледом литературних података су упоређени са резултатима представљеним у овом раду на јасан начин. Кандидат је назначио да не постоје претходни подаци о биолошким

активностима и/или хемијском саставу екстраката, на местима где је то био случај и истакао значајност приказаних резултата у том погледу.

У поглављу **ОПШТА ДИСКУСИЈА** дат је критички осврт на добијене резултате истраживања. Сумирани су резултати квалитативне и квантитативне хемијске анализе екстраката и представљена су доминатна једињења у екстрактима, као и однос фенолних киселина и флавоноида у екстрактима (1 табела). Такође, дат је табеларни приказ биолошких активности екстраката (1 табела). У овом поглављу је дискутована и веза између идентификованих једињења у екстрактима и испољених биолошких активности екстраката, што указује да је кандидат детаљно упознат са релевантном литературом и да је своје резултате логично и са мером интерпретирао дефинишући теме за даља истраживања.

У секцији **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидат изводи закључке који су у складу са постављеним циљевима и произилазе из добијених резултата. У овој дисертацији је показано да антибактеријски ефекат екстраката зависи од тестираног соја и не може се приписати разликама у саставу ћелијског зида бактерија. Метанолни екстракт *P. fruticosa* испољио је најбоље бактерицидно дејство на резистентан сој MRSA у поређењу са осталим анализираним екстрактима. Сви тестирани екстракти имају већи потенцијал инхибиције формирања биофилма *S. aureus* у поређењу са комерцијалним антибиотиком стрептомицином. Инхибиција продукције стафилоксантина зависила је од примењеног екстракта. Екстракт биљке *O. spinosa* показао је израженији антифунгални потенцијал у поређењу са екстрактима *A. cerefolium* и *P. fruticosa*. Резултати добијени проучавањем антибиофилм потенцијала екстраката биљака *A. cerefolium*, *O. spinosa* и *P. fruticosa* указују на значајан антибиофилм потенцијал. Сва три метанолна екстракта испитиваних биљних врста су нарушавала интегритет ћелијске мембране квасца *C. albicans*. У присуству екстракта *O. spinosa* долази до нарушавања биосинтетичког пута ергостерола. Најизраженији антиоксидативни потенцијал међу тестираним екстрактима је испољио метанолни екстракт *P. fruticosa*. Најизраженији ензим-инхибиторни потенцијал је показао екстракт биљке *O. spinosa*. Тестирани екстракти нису показали цитотоксичност према примарним ћелијама HGF1, док се метанолни екстракт *O. spinosa* показао као најефикаснији према туморским ћелијским линијама. Стопа пролиферације A172 ћелија третираних екстрактима *A. cerefolium* и *O. spinosa* била смањена у поређењу са стопом пролиферације контролних ћелија. Третман A172 ћелија са екстрактом *A. cerefolium* индуковао је промену морфологије ових ћелија. Најзначајнију анти-инфламаторну активност показао је екстракт *P. fruticosa*. Упоредном квалитативном и квантитативном хемијском анализом може се закључити да је разноврсност флавоноида у метанолном екстракт *A. cerefolium* велика, али да квантитативно преовлађују фенолне киселине. Квалитативном анализом метанолног екстракта *O. spinosa* идентификовано је 63 полифенолних једињења. Квалитативном анализом екстракта *P. fruticosa* идентификовано је 44 једињења која припадају фенолним киселинама, фенилпропаноидима и флавоноидима. Биолошка

активност екстраката *A. cerefolium*, *O. spinosa* и *P. fruticosa* представљена у овој студији може се барем делимично приписати присуству најдоминантнијих једињења у екстракту. Добијени резултати представљају добру основу за даља *in vivo* испитивања на лабораторијским животињама.

У поглављу ЛИТЕРАТУРА на прегледан начин је приказано 211 цитираних библиографских јединица које су на адекватан начин цитиране у овој докторској дисертацији.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Stojković, D.**, Drakulić, D., Dias, M.I., Zengin, G., Barros, L., Ivanov, M., Gašić, U., Rajčević, N., Stevanović, M., Ferreira, I.C.F.R., Soković, M. *Phlomis fruticosa* L. exerts *in vitro* antineurodegenerative and antioxidant activities and induces prooxidant effect in glioblastoma cell line (2022) EXCLI Journal, 21, pp. 387-399. DOI: 10.17179/excli2021-4487; IF (2020) 4.068 **M21**
Линк: <https://www.excli.de/index.php/excli/article/view/4487>
2. **Stojković, D.**, Gašić, U., Drakulić, D., Zengin, G., Stevanović, M., Rajčević, N., Soković, M. Chemical profiling, antimicrobial, anti-enzymatic, and cytotoxic properties of *Phlomis fruticosa* L. (2021) Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 195, art. no. 113884. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113884; IF (2020) 3.935 **M21**
Линк: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33421668/>
3. **Stojković, D.**, Drakulić, D., Schwirtlich, M., Rajčević, N., Stevanović, M., Soković, M.D., Gašić, U. Extract of herba *anthrisci cerefolii*: Chemical profiling and insights into its anti-glioblastoma and antimicrobial mechanism of actions (2021) Pharmaceuticals, 14 (1), art. no. 55, pp. 1-15. DOI: 10.3390/ph14010055; IF (2020) 5.863 **M21**
Линк: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33445425/>
4. **Stojković, D.**, Drakulić, D., Gašić, U., Zengin, G., Stevanović, M., Rajčević, N., Soković, M. *Ononis spinosa* L., an edible and medicinal plant: UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS chemical profiling and biological activities of the herbal extract (2020) Food and Function, 11 (8), pp. 7138-7151. DOI: 10.1039/d0fo01595d; IF (2020) 5.396 **M21**
Линк: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32749435/>

5. **Stojković, D.**, Dias, M.I., Drakulić, D., Barros, L., Stevanović, M., Ferreira, I.C.F.R., Soković, M.D. Methanolic extract of the herb *Ononis spinosa* L. is an antifungal agent with no cytotoxicity to primary human cells (2020) *Pharmaceuticals*, 13 (4), art. no. 78, pp. 1-13; DOI: 10.3390/ph13040078 IF (2020) 5.863
Линк: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344670/>

M21

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Stojković, D.** Bacteria mediated inflammation on skin cells: Methodology development for anti-inflammatory activity of natural products. The Founding and Annual Conference of Pan-Balkan Alliance of Natural Products and Drug Discovery Associations, Shanghai, China, September 26-27, 2019. M32
2. Drakulić, D., **Stojković, D.**, Soković, M., Stevanović, M. Comparative study of antiproliferative potential of three different plant species. The 2nd Balkans-China mini-symposium on natural products and drug discovery, Belgrade, Serbia, April 11-13, 2019. Book of abstracts: p38. M34

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата **Дејана Стојковића Б3024/2018** послата је дана **29.03.2022.** на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности је добијен дана **29.03.2022.**

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 „**Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Ariaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae)**”, аутора Дејана Стојковића, утврђено је да подударање текста износи 12%. Овај степен подударности последица је цитата, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, поготову у опису коришћених материјала и метода неопходних за израду ове докторске дисертације, као и резултата дисертације које је аутор објавио у међународним часописима.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Дејана Стојковића**, под насловом „**Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Ariaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae)**” те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог комисије

На основу увида у докторску дисертацију **Дејана С. Стојковића**, чији смо приказ дали у овом извештају, као и на основу библиографских података кандидата и непосредног увида у његов рад, имамо следеће мишљење о овој дисертацији и самом кандидату:

Докторска дисертација **Дејана С. Стојковића** под насловом „**Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae)**“ урађена је у складу са принципима и критеријумима доброг научно-истраживачког рада и представља оригиналну научну студију. Кандидат је кроз рад на овој дисертацији показао особине (зрелост, знање, упорност, стрпљење и критицизам) неопходне за сваког успешног истраживача и за стицање звања доктора наука. Радом приказаним у овој докторској дисертацији кандидат је дао значајан допринос расветљавању биолошког потенцијала и хемијског састава метанолних екстраката биљака *A. cerefolium*, *O. spinosa* и *P. fruticosa* и створио простор за будућа истраживања. Имајући у виду све наведено, Комисија за преглед и оцену докторске дисертације позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата **Дејана С. Стојковића**, под насловом „**Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae)**“, и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да **прихвати Извештај и одобри јавну одбрану** ове докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

др Ана Џамић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Данијела Дракулић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и
генетичко инжењерство

др Урош Гашић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за биолошка истраживања “Синиша
Станковић”- Институт од националног значаја за Републику Србију

У Београду 11.04.2022. године.