

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

На VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.05.2022. године, прихваћен је извештај ментора др Драгане Митић-Ђулафић о урађеној докторској дисертацији Стефане Д. Вулетић (рођене Ђукановић), истраживача-сарадника на Катедри за микробиологију Института за ботанику и Ботаничке баште „Јевремовац“, Универзитета у Београду – Биолошког факултета, под називом **„Биолошка активност екстракта крушине (*Frangula alnus*) и његове доминантне компоненте, емодина, у прокариотским и еукариотским тест системима”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Биљана Николић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Наташа Симин, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду – Природно-математички факултет, др Сергеј Томић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за примену нуклеарне енергије „ИНЕП”, др Бранка Лончаревић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за хемију, технологију и металургију, Институт од националног значаја за Републику Србију, и др Стефана Цветковић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

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 Стефане Д. Вулетић, под називом **„Биолошка активност екстракта крушине (*Frangula alnus*) и његове доминантне компоненте, емодина, у прокариотским и еукариотским тест системима“**, јесте истраживање које је проистекло из вишегодишњег испитивања биолошких активности етил-ацетатног екстракта крушине и његове доминантне компоненте емодина, пре свега антибактеријске, антибиофилм, цитотоксичне и генотоксичне активности. Чињеница да је проблем резистенције на конвенционалне терапеутике

све већи, али и да је неопходно смањити нежељене ефекте и пронаћи нове агенсе, била је усмерење за истраживање у овој докторској дисертацији. Ова докторска дисертација је урађена на Катедри за микробиологију, Универзитета у Београду – Биолошког факултета, у лабораторији Катедре за биохемију и хемију природних производа, Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду, у лабораторији групе за микробиолошку хемију и биотехнологију, Универзитета у Београду – Хемијског факултета, у Центру за хемију и Центру за микроелектронске технологије Универзитета у Београду, Института за хемију, технологију и металургију, Института од националног значаја за Републику Србију, на Одељењу за имунологију и имунопаразитологију Института за примену нуклеарне енергије „ИНЕП“, Универзитета у Београду, на Департману за биологију и екологију Универзитета у Новом Саду, Природно-математичког факултета. Истраживања у оквиру ове дисертације реализована су захваљујући националном пројекту „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. године), као и институционалном финансирању Биолошког факултета.

Докторска дисертација садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о ментору и члановима комисије, изјаву захвалности, сажетак са кључним речима на српском и енглеском језику, списак скраћеница, садржај, текст по поглављима, списак литературе и прилоге. Докторска дисертација је написана на 139 страна и подељена је на осам поглавља: Увод (22 стране), Циљеви истраживања (3 стране), Материјал и методе (19 страна), Резултати (44 стране), Дискусија (15 страна), Закључци (3 стране), Литература (21 страна) и Прилози (6 страна). Докторска дисертација садржи 52 слике, 29 табела и 321 библиографску јединицу. 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** докторске дисертације је подељено на пет потпоглавља и садржи адекватне литературне податке значајне за разумевање теме докторске дисертације. У потпоглављу „Бактеријски биофилмови“ дефинисан је појам бактеријских биофилмова, спектар њиховог распрострањења и њихов значај у природи и медицини. У оквиру овог потпоглавља налазе се два поднаслова: „Структура и хетерогеност биофилма” и „Формирање биофилмова”. У

оквиру првог поднаслова, објашњена је организација и грађа самог биофилма, као и хетерогеност која се јавља на физиолошком нивоу (градијент нутријената, кисеоника, рН). Додатно је дефинисан појам екстрацелуларног матрикса биофилма и наведене су компоненте које улазе у његов састав као и њихов значај за биофилм. Такође, указано је и на улогу ћелија перзистера у биофилмовима које су одговорне за високу резистенцију у њима. Други поднаслов се бави процесом и фазама формирања бактеријских биофилмова и факторима који утичу на овај процес.

У оквиру потпоглавља „Бактеријска резистенција” дефинисан је појам антибиотика као и ток развоја бактеријске резистенције од открића пеницилина. Додатно је и дефинисан појам резистенције на антимицробне агенсе, дата је подела антимицробних агенаса као и механизма њиховог деловања. Јасно је истакнут проблем бактеријске резистенције и дат је преглед бактерија које су приоритет за проналажење нових агенаса због њихове резистенције на велики број антибиотика. Ово потпоглавље садржи поднаслов „Механизми резистенције на антимицробне агенсе” у оквиру ког су концизно објашњени механизми резистенције у планктонској животној форми и на нивоу биофилмова обзиром да се механизми на ова два нивоа разликују. Имајући у виду бактеријску резистенцију, од значаја је разумети механизме на ова два нивоа како би се лакше стигло до адекватног решења овог проблема.

Како је дата листа приоритетних патогена, на којој се види да је један од њих сој *Staphylococcus aureus*, следеће потпоглавље се бавило биологијом ове врсте. Приказане су његове морфолошке и физиолошке карактеристике као и бројне еколошке нише које овај патоген заузима. Указано је и на озбиљност овог патогена обзиром да може бити изазивач благих али и озбиљних хроничних инфекција и тешких болничких инфекција. Додатно је указано и на његову резистенцију на широк спектар антибиотика. Оваквом понашању овог соја доприноси велики број фактора вируленције које поседује, међу којима је способност формирања биофилма на различитим површинама, али и способност продукције пигмента стафилоксантина. Додатно, чињеница да је овај патоген факултативни анаероб даје му још већу предност да се прилагоди, опстане и одупре деловању антибиотика. Врло је интересантна веза између фактора вируленције, нарочито биофилма и самог метаболизма која иначе није много испитана. Стога се у оквиру овог потпоглавља налазе поднаслови „Биофилм *S. aureus*”, „Метаболизам *S. aureus*” и „Стафилоксантин”. У оквиру првог поднаслова детаљно је објашњен процес формирања биофилма код овог патогена. Познато је да код *S. aureus* постоји више путева којим се формира биофилм, а најдоминантнији је путем полисахаридног интрацелуларног адхезина (ПИА). На основу тога путеви формирања су подељени на ПИА-зависне и ПИА-

независне путеве које је аутор објаснио у посебним одељцима у оквиру овог поднаслова. У следећем поднаслову дате су информације о метаболизму ове бактерије са посебним освртом на двокомпонентни систем који учествује у преласку са аеробног на анаеробно дисање – srgAB. Истакнута је и веза метаболизма, тачније наведеног комплекса и биофилма, али и генима који учествују у овим процесима. У последњем поднаслову („Стафилоксантин”) указано је на значај каротеноидног пигмента стафилоксантина код поменутог соја, као и предности које му омогућава.

Како се резистенција јавља не само на антибиотике већ и на доступне хемиотерапеутике, у наредном потпоглављу стављен је акценат на канцер као комплексно обољење које данас представља велики проблем за човечанство. Кандидат је приказао како долази до трансформације нормалних у канцерске ћелије и дао карактеристике канцерских ћелија. Додатно, дат је приказ начина лечења канцера и подела доступних хемиотерапеутика. Потпоглавље је обухватило четири поднаслова. Први поднаслов „Резистенција канцерских ћелија” бави се настанком и механизмима резистенције канцерских ћелија на хемиотерапеутике. Наредна три поднаслова („Ћелијски циклус”, „Ћелијска смрт” и „Митохондријски мембрански потенцијал”) баве се процесима есенцијалним за ћелије, али који могу бити циљна места за деловање нових агенаса.

С обзиром на горе представљене проблеме намеће се потрага за новим агенсима, а највише међу природним изворима. Стога, у следећем потпоглављу „Природни извори нових биоактивних једињења” описују се природни извори богати биоактивним једињењима и објашњава шта даје предност природним производима у односу на остале. Међу природним изворима, посебно се истичу биљке обзиром да се дуго користе у традиционалној медицини у разне сврхе. Према томе, први поднаслов у овом поглављу, „Биљке – извор нових агенаса” бави се употребом биљака кроз историју, врстама секундарних метаболита биљака, њиховом активношћу и механизмима деловања. Ово потпоглавље састоји се од једног поднаслова, „*Frangula alnus*” где су описане морфолошке карактеристике биљке *Frangula alnus*, њено распрострањење и примена у традиционалној медицини. Надаље, описан је хемијски састав биљке као и значај антрахинона којима је биљка богата, а потом је истакнута доминантна компонента крушине – емодин. Додатно, наведена су бројна лековита и благотворна својства крушине и емодина као и до сада описане њихове биолошке активности.

У поглављу **Циљеви истраживања** дефинисани су следећи главни циљеви и подциљеви неопходни за њихово реализовање:

- Припрема етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus*;

- Хемијска карактеризација припремљеног екстракта (квалитативна анализа екстракта применом GC×GC/MS методе и квантитативна анализа фенолних једињења у добијеном екстракту применом LC-MS/MS);
- Анализа антиоксидативне активности етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus* и емодина (способност неутрализације DPPH радикала у DPPH тесту и способност инхибиције липидне пероксидације у TBA тесту);
- Испитивање антибактеријског ефекта етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus* и емодина према одабраним сојевима *Staphylococcus aureus* (утврђивање минималних инхибиторних и минималних бактерицидних концентрација, као и ефекта на преживљавање тестираних сојева применом микродилуционе методе, утврђивање типа интеракције између тест супстанци и антибиотика ванкомицина применом методе шаховске табле);
- Испитивање антибиофилм активности етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus* и емодина на одабраним сојевима *Staphylococcus aureus* (активност на формирање биофилма квантификацијом биомасе биофилма кристал виолетом, активност на већ формиране биофилмове квантификацијом биомасе биофилма кристал виолетом, ефекат на екстрацелуларне полисахариде у матриксу формираних биофилмова, ефекат на количину eDNK у матриксу формираних биофилмова, ефекат на број ћелија перзистера у формираним биофилмовима, ефекат на структуру већ формираних биофилмова применом SEM микроскопије, ефекат на структуру и храпавост већ формираних биофилмова применом AFM микроскопије);
- Испитивање антибиофилм активности комбинације тест супстанци са антибиотиком ванкомицином на одабраним сојевима *S. aureus* (активност на формирање биофилма квантификацијом биомасе биофилма кристал виолетом, активност на већ формиране биофилмове квантификацијом биомасе биофилма кристал виолетом);
- Испитивање етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus* и емодина на продукцију фактора вируленције, пигмента стафилоксантина, код *S. aureus* сојева
- Утврђивање потенцијалног механизма антибиофилм деловања етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus* и емодина (праћење ефекта на аеробну респирацију сојева *S. aureus* у планктонској и биофилм форми, праћење комбинованог ефекта тест супстанци и антибиотика ванкомицина на аеробну респирацију сојева *S. aureus* у планктонској и биофилм форми, праћење ефекта на експресију *icaA*, *icaD*, *srrA* и *srrB* гена као и на микро RNK (RNA III));
- Анализа цитотоксичног потенцијала етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus* и емодина на НерG2, НСТ 116 и MRC-5 ћелијским линијама (праћење ефекта на вијабилност ћелија применом

МТТ теста, праћење ефекта на ћелијски циклус применом проточне цитометрије, утврђивање типа ћелијске смрти, праћење ефекта на митохондријски мембрански потенцијал);

- Анализа генотоксичног потенцијала етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus* и емолина на HepG2, HCT 116 и MRC-5 ћелијским линијама применом комет теста.

Поглавље **Материјал и методе** чине два потпоглавља. У потпоглављу „**Материјал**” наведени су: 1) биљни материјал коришћен за прављење екстракта; 2) чисто једињење емодин; 3) раствори коришћени у тестовима антиоксидативности; 4) биолошки материјал који обухвата описане бактеријске сојеве и ћелијске линије које су коришћене за рад; 5) хранљиве подлоге, раствори, китови и прајмери за рад са бактеријским културама; 6) хранљиве подлоге, раствори и китови за рад са хуманим ћелијским линијама.

Друго потпоглавље („**Методе**”) даје детаљне информације о методама које су примењене за прављење биљног екстракта, његову хемијску карактеризацију, одређивање антиоксидативног потенцијала, испитивање антимикуробног и антибиофилм потенцијала, анализу цитотоксичности и генотоксичности. Одељак „Припрема етил-ацетатног екстракта коре *F. alnus*” даје приказ методе за припрему екстракта. У оквиру следећег одељка „Хемијска карактеризација етил-ацетатног екстракта *F. alnus*” налазе се два пододељка у којима се најпре објашњавају квалитативна (GC×GC/MS) и квантитативна (LC-MS/MS) анализа екстракта крушине. Одељак „Испитивање антиоксидативне активности” садржи два пододељка у којима су описане спектрофотометријске методе за одређивање антиоксидативног потенцијала применом DPPH теста за одређивање способности неутрализације DPPH радикала и TBA теста за одређивање способности инхибиције липидне пероксидације. У одељку „Испитивање биолошких активности на прокариотским тест системима” најпре су у оквиру првог пододељка дате информације о гајењу и припреми бактеријских култура за рад. Затим, у следећем пододељку детаљно описан протокол микродилуционог теста којим је испитан антимикуробни потенцијал екстракта и емолина на сојевима *S. aureus* али и метода шаховске табле којом је испитан комбиновани ефекат тест супстанци и антибиотика ванкомицина. Следећи пододељак се бави описивањем испитивања антибиофилм активности који је обухватио описивање метода за праћење ефекта на формирање биофилмова, ефекта на већ формиране биофилмове, ефекта на екстрацелуларне полисахариде формираних биофилмова, ефекта на концентрацију еДНК у биофилмовима, ефекта на број ћелија перзистера у биофилмовима као и на продукцију пигмента стафилоксантина. Додатно описане су и методе микроскопирања (SEM и AFM). Наредни пододељак даје приказ метода за праћење ефекта тест супстанци на аеробну респирацију сојева како у планктонској тако и у биофилм животној форми. У пододељку „Молекуларне анализе”

аутор описује методе екстракције ДНК, умножавање фрагмената ДНК и њихову визуелизацију, екстракцију РНК као и праћења ефекта екстракта и емолина на експресију одабраних гена. Даље, одељак „Испитивање биолошке активности на ћелијским културама” обухвата пре свега пододељак у ком се описују поступци за замрзавање, оживљавање и гајење, трипсинизацију и одређивања броја ћелија методом бојења трипан плавим. У наредним пододељцима описане су методе за процену вијабилности ћелијских линија (МТТ тест), ефекта на ћелијски циклус одабраних ћелијских линија, ефекта на индуковање ћелијске смрти ћелијских линија и ефекта на митохондријски мембрански потенцијал ћелијских линија. Последњи пододељак даје детаљан протокол за процену генотоксичног потенцијала екстракта крушине и емолина. На крају потпоглавља „Методe” налази се одељак „Статистичка обрада података” у коме су описане методе за статистичку анализу добијених резултата.

Поглавље **Резултати** је подељено на 5 потпоглавља: 1) Хемијска карактеризација етил-ацетатног екстракта *F. alnus*; 2) Антиоксидативна активност етил-ацетатног екстракта *F. alnus* и емолина; 3) Испитивање ефекта FA екстракта и емолина на прокариотским тест системима; 4) Цитотоксична активност FA екстракта и емолина; 5) Генотоксични потенцијал FA екстракта и емолина. Најпре су у првом потпоглављу (у два одељка) приказани табеларно резултати квалитативне анализе екстракта (дати по процентуалној заступљености) и квантитативне анализе фенола и флавоноида у екстракту (приказани као  $\mu\text{g/g}$  суве масе). Показано је да је екстракт богат фенолним једињењима, као и да је емодин веома заступљен те је изабран за даља испитивања.

У оквиру другог потпоглавља, приказани су резултати испитивања антиоксидативне активности екстракта и емолина. Прво су приказани резултати DPPH теста где је показано да екстракт има снажну антиоксидативну активност, а потом и резултати TBA теста где је показана способност екстракта да инхибира процес липидне пероксидације, за разлику од емолина.

Наредно потпоглавље даје резултате испитивања антибактеријске и антибиофилм активности. У оквиру поднаслова „Антибактеријска активност екстракта и емолина”, дати су резултати добијени у микродилуционој методи и то упоредо праћењем оптичке густине и промене индикаторске боје ресазурина. Показано је да су сви сојеви *S. aureus* осетљиви на деловање обе супстанце али да оне немају бактерицидну активност. Такође, графички је приказан и ефекат тест супстанци на преживљавање сојева. Додатно, дати су резултати испитивања комбинованог ефекта екстракта и емолина са антибиотиком ванкомицином те су одабрана два соја за даље тестирање (комбинација емодин и антибиотик). Поднаслов „Антибиофилм активност екстракта и емолина” даје пре свега графички приказане

резултате деловања екстракта и емодина, али и комбинованог третмана, на спречавање формирања биофилма као и на већ формиране биофилмове. Резултати овог дела указују на изразиту способност супстанци да инхибирају процес формирања биофилма док је њихов ефекат на већ формиране биофилмове нешто слабији. Овај поднаслов обухватио је и одељак са резултатима ефекта тест супстанци на екстрацелуларне полисахариде биофилма (растворне и нерастворне у води) и на еДНК, где се види да обе тест супстанце мењају концентрације компоненти матрикса биофилма. Такође, дати су резултати који указују да екстракт и емодин у одређеној мери смањују број ћелија перзистера у формираним биофилмовима. Даље, табеларно и графички су приказани резултати ефекта тест супстанци на продукцију пигмента стафилоксантина који показују да значајног инхибиторног ефекта није било. Додатно, одељак „SEM микроскопија” даје микрографије са ефектом екстракта на већ формиране биофилмове сојева где се примећују промене у биофилмовима и реорганизацији матрикса биофилма. Такође, у одељку „AFM микроскопија” приказане су 3D топографије формираних биофилмова третираних екстрактом и емодином где се примећују бројне структурне и морфолошке промене на нивоу биофилмова, а такође су табеларно представљене и промене у храпавости ових биофилмова. Надаље, у следећем одељку приказани су резултати деловања екстракта и емодина на аеробну респирацију сојева у планктонској и биофилм животној форми и указано је на инхибиторно деловање обе тест супстанце, нарочито у планктонској форми. На крају, у последњем одељку, у циљу расветљавања механизма деловања обе тест супстанце, приказани су резултати њиховог деловања на експресију одабраних гена (*icaA*, *icaD*, *srrA*, *srrB*) и микро РНК – RNA III и примећено је да је деловање специфично за сваки сој.

Четврто потпоглавље обухвата резултате испитивања цитотоксичног потенцијала екстракта крушине и емодина на НерG2, НСТ116 и МРС-5 ћелијским линијама. У првом одељку овог потпоглавља приказани су резултати ефекта тест супстанци на вијабилност ћелијских линија, добијени применом МТТ теста, при чему је забележена цитотоксична активност на канцерским ћелијским линијама (НерG2 и НСТ116). Даље, у следећем одељку, графички су приказани резултати деловања на ћелијски циклус одабраних ћелијских линија и показано је да код свих ћелијских линија долази до ремећења овог процеса у одеђеним фазама, као и да постоји велики број апоптотичних ћелија. Додатно, приказани су резултати који показују да обе тест супстанце, код свих ћелијских линија доводе до индукције ћелијске смрти и то апоптозе, а у мањој мери и некрозе. При томе је уочена већа осетљивост канцерских НерG2 и НСТ116 ћелија на примењене супстанце у односу на имортализовану МРС-5 ћелијску линију. У последњем



одељку, дати су резултати који показују да екстракт и емодин ремете и митохондријски мембрански потенцијал код све три ћелијске линије.

Последње потпоглавље „Генотоксични потенцијал FA екстракта и емодина” приказује резултате добијене применом Комет теста. Резултати који су приказани, указују на снажан генотоксични потенцијал обе тест супстанце који се може видети код све три тестиране ћелијске линије.

Поглавље **Дискусија** чини једну целину где аутор на детаљан начин анализира и објашњава добијене резултате, поредећи их са досадашњим доступним литературним подацима за ове области истраживања. На почетку самог поглавља објашњена је потреба за датим истраживањем. Истакнут је проблем смањене ефикасности доступних лекова што у лечењу бактеријских инфекција, што у лечењу канцера и указано је на потребу за проналаском нових агенаса, пре свега природног порекла. Дат је и преглед познатих биолошких активности биљке *Frangula alnus*. У даљем тексту, дискутован је хемијски састав етил-ацетатног екстракта крушине и поређен са до сада доступним подацима у литератури.

Како биљке захваљујући бројним секундарним метаболитима, остварују своју активност на различите начине, између осталих и преко антиоксидативности, следећи део се бавио дискутовањем антиоксидативног потенцијала екстракта и емодина. Такође, указано је на потенцијални допринос одређених група секундарних метаболита које могу бити одговорне за антиоксидативну активност екстракта.

Обзиром на велики проблем бактеријске резистенције, надаље је детаљно дискутован добијен антибактеријски ефекат екстракта и емодина, при чему су истакнуте сличности и разлике са постојећим подацима о антибактеријској активности обе тест супстанце. Дискутован је и могућ допринос појединих једињења/група једињења за овакву активност, али и могући механизам путем ког се остварује снажно инхибиторно деловање на сојеве *S. aureus*. Такође, поређени су и добијени резултати комбинованог третмана са постојећим литературним подацима и дат значај комбинованих третмана у терапији.

Како бактеријски биофилмови представљају велику препреку у лечењу бактеријских инфекција, посебно болничких, те и да је антибиофилм активност крушине и емодина слабије испитана, аутор се детаљно бави објашњењима добијених резултата антибиофилм активности супстанци али и комбинованих третмана. Најпре, указује се на значај деловања супстанци на процес формирања биофилмова. Добијени резултати поређени су са резултатима истраживања других аутора, али је и дискутован могући допринос одређених конституената за овакву активност. Аутор даје и објашњења за добар антибиофилм ефекат суб-инхибиторних

концентрација. Надаље, дискутује се о потенцијалној вези између процеса формирања биофилма и аеробне респирације сојева *S. aureus* у планктонској животној форми. Како се код појединих сојева уочава ефекат на метаболизам, али и ефекат на стимулацију формирања биофилма, аутор даје могућа објашњења за овако добијене резултате. Следећа целина бави се ефектом тест супстанци на формираним биофилмовима који представљају изразит проблем за успешно деловање антибиотика. Такође, и у овом делу аутор истиче значај везе метаболизма, резистенције и биофилма те дискутује добијене резултате праћења аеробне респирације и резултате добијене квантификацијом биомасе биофилмова. Резултати су упоређени и са оним добијеним на микрографијама SEM и AFM микроскопирања. Како је неопходно осим нових агенаса, пронаћи и нове стратегије у борби са бактеријским биофилмовима, у наредним целинама овог поглавља коментарисани су резултати о деловању на компоненте матрикса (екстрацелуларне полисахариде и еДНК), али и на ћелије перзистера у биофилмовима. Истакнут је значај ових компоненти те су резултати упоређени са оним доступним у литератури. Додатно, имајући у виду значај фактора вируленције, дискутован је и ефекат на продукцију пигмента стафилоксантина. На крају дела који се односи на антибиофилм активност екстракта и емодина, продискутовани су добијени резултати о деловању ових супстанци на експресију одабраних гена и микро РНК. Такође, указано је на значај ових гена у процесу формирања биофилмова и метаболизма као и њихова међусобна повезаност.

У наредним одељцима, указано је на проблем резистенције ћелија канцера на доступне хемиотерапеутике и дискутован је цитотоксични потенцијал екстракта и емодина, а резултати су поређени са резултатима других студија. Дискутован је и цитотоксични потенцијал одређених једињења присутних у екстракту крушине. Даље, истакнуто је да се често цитотоксични потенцијал остварује деловањем на ћелијски циклус, али и индуковањем апоптозе те су коментарисани резултати добијени испитивањем ефекта тест супстанци на процес ћелијског циклуса али и ћелијске смрти. Како би се додатно објаснио цитотоксични потенцијал тест супстанци, аутор објашњава и ефекат на митохондријски потенцијал поредећи резултате са литературним подацима. На крају аутор обједињује ефекте на ова три ћелијска процеса у циљу расветљавања потенцијалног механизма деловања. Такође, у наредном одељку бави се дискутовањем генотоксичног потенцијала екстракта и емодина као и везом између генотоксичности и ефекта на ћелијски циклус и апоптозу.

На крају овог поглавља истиче се значај истраживања, али и потенцијална примена екстракта крушине и његове доминантне компоненте емодина.

У поглављу **Закључци** изнета су 22 концизна закључка који су проистекли из резултата истраживања ове докторске дисертације. Као крајњи закључак истакнут је потенцијал екстракта *F. alnus* и емолина да буду искоришћени као добри кандидати за нове антибиофилм агенсе, али и нове агенсе који би помогли у терапији канцера.

У поглављу **Литература** наведена је 321 библиографска јединица. Сви цитирани литературни извори су актуелни и од значаја за тематику докторске дисертације. Ови извори омогућили су боље разумевање и објашњење добијених резултата и адекватно су означени у самом тексту дисертације.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Đukanović, S.**, Cvetković, S., Lončarević, B., Lješević, M., Nikolić, B., Simin, N., Bekvalac, K., Kekić, D., Mitić-Ćulafić, D. 2020. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of *Frangula alnus* bark ethyl-acetate extract. *Ind Crops Prod*, 158, 113013.  
**M21a (IF= 5,645), <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113013>**
2. **Đukanović, S.**, Ganić, T., Lončarević, B., Cvetković, S., Nikolić, B., Tenji, D., Randjelović, D., Mitić-Ćulafić, D. 2021. Elucidating the antibiofilm activity of *Frangula emodin* against *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* **M22 (IF=3,772), <https://doi.org/10.1111/jam.15360>**

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

1. **Djukanovic, S.**, Cvetkovic, S., Ganic, T., Nikolic, B., Mitic-Culafic, D. 2021. Potential of *Frangula alnus* to contribute to food safety: antibiofilm effect against *Staphylococcus aureus*. The 61st International Meat Industry Conference Meatcon 2021, Zlatibor, Serbia, Proceedings, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 854, (1), art.no. 012024.  
**<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/854/1/012024>**

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

1. Mitić-Ćulafić D., **Đukanović S.**, Cvetković S., Kekić D., Perić M., Knežević-Vukčević J. Nikolić B. 2019. Antibacterial activity of *Frangula alnus* extracts against *Staphylococcus aureus* strains forming biofilm. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara Planina Mt., Serbia. Book of abstracts, 16463.
2. Cvetković, S., **Đukanović, S.**, Simin, N., Nikolić, B., Knezević-Vukčević, J, Kekić, D, Mitić Ćulafić, D. 2020. The effect of *Frangula alnus* extract on biofilm disruption of *Staphylococcus aureus* MSSA and MRSA strains. FEMS Online Conference on Microbiology, 28-31.10. 2020, Belgrade, Serbia, e-Abstract Book, p-346.
3. **Đukanović, S.**, Cvetković, S., Lončarević, B., Nikolić, B., Knezević-Vukčević, J., Kekić, D, Mitić-Ćulafić, D. 2020. Combined effect of vankomycin and emodin on *Staphylococcus aureus* MSSA and MRSA isolates. FEMS Online Conference on Microbiology, 28-31.10. 2020, Belgrade, Serbia, e-Abstract Book, p-347.
4. Ganić, T., **Đukanović, S.**, Lončarević, B., Cvetković, S., Nikolić, B., Tenji, D., Kekić, D., Mitić-Ćulafić, D. 2021. Assessment of *Frangula alnus* ethyl-acetate extract on biofilm

disruption and bacterial respiration of *Staphylococcus aureus* strains. 1st International Online Conference, Natural products application: Health, Cosmetic and Food, 4-5.2. 2021, e-Abstract Book, ISBN 978- 972-745-286-6, p-161.

5. **Đukanović, S.**, Ganić, T., Lončarević, B., Cvetković, S., Nikolić, B., Tenji, D., Kekić, D. Mitić-Ćulafić, D. 2021. Antibiofilm activity of emodin on *Staphylococcus aureus* and its effect on aerobic respiration. 1st International Online Conference, Natural products application: Health, Cosmetic and Food, 4-5.2. 2021, e-Abstract Book, ISBN 978-972-745-286-6, p-160.
6. **Đukanović, S.**, Lješević, M., Simin, N., Lončarević, B., Ganić, T., Nikolić, B., Cvetković, S., Mitić-Ćulafić, D. 2021. Chemical characterization and investigation of biological activities of *Frangula alnus* ethyl-acetate extract. Quo Vadis Life Sciences, XII Polish Chromatography Conference (PKChrom 2021), XIII International Scientific Conference Ion Chromatography and Related Techniques 2021 (IC 2021) and II International Conference on Ion Analysis (ICIA2021), 23-27. 6. 2021, Opole, Poland, e-Abstract Book, p-147.

### **Провера оригиналности докторске дисертације**

Докторска дисертација кандидата Стефане Д. Вулетић, број индекса Б3007/2017, послата је 10.05.2022. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио истог дана. На основу извештаја који је добијен анализом докторске дисертације Стефане Д. Вулетић под насловом „**Биолошка активност екстракта крушине (*Frangula alnus*) и његове доминантне компоненте, емолина, у прокариотским и еукариотским тест системима**” коришћењем програма iThenticate, добијен је индекс сличности који износи 14%. Увидом у извештај утврђено је да је добијен степен подударности последица пре свега претходно публикованих резултата докторандових истраживања, проистеклих из ове дисертације. Уз то, индексу подударности допринели су и неки општи подаци, као што су латинска имена микроорганизама, скраћенице, библиографски подаци о коришћеној литератури, списак материјала и опис метода. Поједини делови текста који показују подударност нису повезани са тематиком докторске дисертације и немају смисао.

Када се све изнето узме у обзир, а у складу са чланом 8., став 2, Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Стефане Д. Вулетић, под насловом „**Биолошка активност екстракта крушине (*Frangula alnus*) и његове доминантне**

компоненте, емодина, у прокариотским и еукариотским тест системима”, те се прописани поступак за њену одбрану може наставити.

### **Мишљење и предлог Комисије**

Докторска дисертација Стефане Д. Вулетић представља оригинални научно-истраживачки рад који се бави испитивањем биолошке активности екстракта крушине и његове доминантне компоненте емодина, са циљем њихове употребе у терапији бактеријских инфекција и канцера. Добијени резултати представљају први извештај о антибиофилм активности крушине на клиничким изолатима *S. aureus*, као и вези метаболизма, бактеријске резистенције и биофилмова. Такође, додатно доприноси бољем разумевању цитотоксичног и генотоксичног потенцијала екстракта крушине и емодина на одабраним ћелијским линијама. Дисертација се одликује јасно дефинисаним циљевима, адекватним методама и успешно реализованим експериментима.

Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална међународна научна рада, од којих је први објављен у међународном часопису изузетних вредности, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Имајући у виду експериментални рад, остварене резултате и написану докторску дисертацију, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску дисертацију. Имајући све горе наведено у виду, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидата **Стефане Д. Вулетић**, под насловом „**Биолошка активност екстракта крушине (*Frangula alnus*) и његове доминантне компоненте, емодина, у прокариотским и еукариотским тест системима**”, и омогући кандидату јавну одбрану рада.

У Београду, 13.05.2022. године

## КОМИСИЈА

---

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

---

др Наташа Симин, ванредни професор,  
Универзитет у Новом Саду – Природно-математички факултет

---

др Сергеј Томић, виши научни сарадник,  
Универзитет у Београду –  
Институт за примену нуклеарне енергије, „ИНЕП”

---

др Бранка Лончаревић, научни сарадник,  
Универзитет у Београду –  
Институт за хемију, технологију и металургију (ИХТМ)  
Институт од националног значаја за Републику Србију

---

др Стефана Цветковић, научни сарадник,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет