

3  
4  
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6  
7 I PODACI O KOMISIJI:

8  
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

10 Nastavno-naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 187.  
11 Sednica održana 20.06.2018. godine.

12  
13 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže  
14 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,  
15 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

- 16 1. Dr Dušan Mišić, vanredni profesor, mikrobiologija sa imunologijom, 2014. godina,  
17 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu  
18 2. Dr Lidija Šenerović, viši naučni saradnik, molekularna mikrobiologija, 2016. godina,  
19 Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu  
20 3. Dr Marina Radojičić, vanredni profesor, mikrobiologija sa imunologijom, 2017. godina,  
21 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu  
22 4. Dr Ivana Morić, viši naučni saradnik, molekularna mikrobiologija, 2018. godina,  
23 Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu  
24 5. Dr Jelena Ašanin, naučni saradnik, biotehnologija, veterinarstvo, 2016. godina,  
25 Inovacioni centar Tehnološko–metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu

26  
27 II PODACI O KANDIDATU:

28  
29 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

30 Dušan, Radovan, Milivojević

31  
32 2. Datum rođenja, opština, Republika:

33 17.08.1986. godine, Valjevo, Republika Srbija

34  
35 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze\*:

36 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka\*:

37  
38 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

39 „Ispitivanje odabranih faktora virulencije kod izolata *Pseudomonas aeruginosa* i njihova  
40 osetljivost na komplekse srebra“

41  
42 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,  
43 grafikona i sl.):

44 Doktorska disertacija Dušana Milivojevića napisana je na 177 strana kompjuterski obrađenog  
45 teksta i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (četiri strane), Pregled literature (50 strana), Cilj i  
46 zadaci istraživanja (dve strane), Materijal i metode (35 strana), Rezultati (39 strana), Diskusija  
47 (16 strana), Zaključci (dve strane), Spisak literature (29 strana). Naslovna strana na srpskom i  
48 engleskom jeziku, podaci o komisiji, zahvalnica, rezime na srpskom i engleskom jeziku,  
49 sadržaj disertacije i spisak skraćenica se nalaze na početku doktorske disertacije i nisu  
50 numerisani. Biografija i izjave kandidata se nalaze na kraju doktorske disertacije i nisu  
51 numerisane. Disertacija je dokumentovana sa 32 slike (u poglavlju pregled literature četiri  
52 slike, u poglavlju materijal i metode dve slike i u poglavlju rezultati 26 slika) i 13 tabela (u  
53 poglavlju pregled literature tri tabele, u poglavlju materijal i metode tri tabele i u poglavlju  
54 rezultati sedam tabela).

1 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**  
2 **svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,**  
3 **materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):**

4 U poglavlju **Uvod** prikazan je medicinski značaj vrste *Pseudomonas aeruginosa*,  
5 uzročnika akutnih i hroničnih infekcija kod životinja i ljudi. Ovu vrstu karakteriše veliki broj  
6 faktora virulencije i kompleksna regulatorna mreža signala, koji joj obezbeđuju veliki patogeni  
7 potencijal i omogućavaju da se prilagodi životu u najrazličitijim uslovima sredine. U Uvodu je  
8 ukratko prikazan jedan od najznačajnijih faktora virulencije *P. aeruginosa*, a to je njego  
9va sposobnost formiranja biofilмова. Biofilmovi ove vrste formirani na tkivima pacijenata ili  
10 površinama medicinskih pomagala mogu biti do 1000 puta rezistentniji na tretman  
11 antibakterijskim agensima od planktonskih formi iste vrste. Infekcije praćene formiranjem  
12 biofilmovima se teško leče, često su hronične, a karakterišu ih perzistentna inflamacija i  
13 oštećenja tkivâ. Da bi se povećala uspešnost lečenja hroničnih pseudomonasnih infekcija,  
14 neophodno je razviti nove terapeutike koji će, pored efikasnog tretmana planktonskih ćelija,  
15 omogućiti i efikasno uklanjanje biofilмова. Kompleksi metala, konkretno kompleksi srebra(I),  
16 opisani su kao antibakterijski agensi sa velikim potencijalom za primenu u lečenju bakterijskih  
17 infekcija, zbog svoje izrazite antibakterijske aktivnosti i niske toksičnosti za ćelije sisara. U  
18 ovom poglavlju istaknut je i značaj drugih faktora virulencije *P. aeruginosa* za proces  
19 uspostavljanja infekcije.

20 Istraživanja ove vrste su najčešće fokusirana na jednu vrstu uzoraka izolovanih iz  
21 jednog domaćina, najčešće čoveka, dok su istraživanja na izolatima iz životinja malobrojna i  
22 manje opsežna.

23 U poglavlju **Pregled literature** kandidat prvo prikazuje osnovne karakteristike vrste *P.*  
24 *aeruginosa* sa osvrtom na njenu taksonomiju, mikrobiološke karakteristike i rasprostranjenost.  
25 U ovom poglavlju je detaljno prikazan značaj različitih faktora virulencije za uspostavljanje  
26 patogeneze pseudomonasnih infekcija. Faktori virulencije grupisani su kao faktori virulencije  
27 povezani sa ćelijama, ekstracelularni faktori virulencije i sekrecioni sistemi tipa I, II i III.  
28 Detaljno je razmatrana sposobnost međubakterijske komunikacije kod *P.aeruginosa* (*quorum*  
29 *sensing*), kao i infektivni značaj fosfolipaze C, lipopolisaharida, pila, flagela, produkcije  
30 piocijanina, siderofora, ramnolipida, proteinaza, cijanovodonika, egzotoksina A i lektina.

31 Posebna pažnja u ovom poglavlju posvećena je detaljnom opisu procesa formiranja  
32 biofilмова, strukture ekstracelularnog matriksa, kao i njihovom medicinskom značaju.  
33 Biofilmovi predstavljaju strukturnu zajednicu mikroorganizama uronjenu u ekstracelularni  
34 matriks sastavljen od polisaharida, proteina i DNK poreklom od samih mikroorganizama,  
35 pričvršćenu za organsku ili neorgansku površinu. Prelazeći iz slobodnoživeće, planktonske  
36 forme u formu biofilma, *P. aeruginosa* gubi pokretljivost, ali dobija zaštitu od fagocitozne  
37 aktivnosti imunološkog sistema domaćina, oksidativnog stresa i delovanja antibiotika. Značaj  
38 biofilмова *P. aeruginosa* u medicini i veterini ogleda se prvenstveno u sposobnosti ove vrste  
39 da izazove hroničnu infekciju. Biofilmovi se mogu formirati na različitim organskim i  
40 neorganskim površinama kao što su različita tkiva životinja i ljudi, medicinska pomagala, cevi i  
41 posude za vodu, zidovi prostorija i podovi. Oslobođanjem bakterija iz biofilмова formiranih u  
42 organizmima ljudi i životinja dolazi do egzacerbacije hronične bolesti i potencijalno teških  
43 akutnih stanja kao što je sepsa. Rasejavanje ćelija iz biofilma je razlog za pojavu rekurentnih  
44 infekcija, čak i posle hirurškog uklanjanja afektiranog tkiva ili kontaminiranog implanta.

45 Značajna pažnja posvećena je toleranciji biofilмова *P. aeruginosa* na antibakterijske  
46 agense koja se, udružena sa rezistencijom bakterija na antibiotike, često sreće u hroničnim  
47 infekcijama, čime se dodatno komplikuje njihovo lečenje. Prikazujući različite strategije u borbi  
48 protiv pseudomonasnih infekcija, kandidat naglašava sve veći značaj jona metala s obzirom  
49 da pokazuju veliki antibakterijski potencijal, sinergističko dejstvo sa drugim antibakterijskim  
50 sredstvima, sposobnost degradacije biofilma i selektivnu inhibiciju određenih metaboličkih  
51 puteva u ćeliji. Zbog visoke antibakterijske aktivnosti i niske toksičnosti za eukariotske ćelije,  
52 kompleksna jedinjenja srebra(I) poseduju bolje terapeutske karakteristike od ostalih vrsta  
53 metala sa antibakterijskom aktivnošću. Antibakterijska aktivnost srebra je atraktivna i zbog  
54 novootkrivenog fenomena produžene baktericidne aktivnosti nazvanog „zombi” efekat, gde  
55 ubijene bakterije predstavljaju rezervoar jona srebra koji mogu da deluju na preostale žive  
56 bakterije. Rezistencija na srebro je moguća putem mutacije gena, ali to se retko dešava, a i  
57 kada se desi da bakterija stekne gene za rezistenciju na srebro ona se teško prenosi na  
58 druge mikroorganizme.

59  
60

1 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja** kandidat navodi da su istraživanja u okviru  
2 doktorske disertacije imala tri specifična cilja:

- 3 1. Upporedna analiza odabranih faktora virulencije izolata *P. aeruginosa* izolovanih iz  
4 različitih vrsta uzoraka poreklom od životinja i ljudi sa referentnim sojem *P.*  
5 *aeruginosa* PAO1 i testiranje njihovog virulentnog i infektivnog potencijala *in vitro* na  
6 ćelijama iz ćelijske linije A549 i *in vivo* na modelu nematode *Caenorhabditis elegans*,  
7 odnosno modelu embriona zebrica (*Danio rerio*).
- 8 2. Upporedna analiza ekspresije gena virulencije odgovornih za sintezu polisaharidnih  
9 komponenata ekstracelularnog matriksa, komponenata signalnih puteva  
10 međubakterijske komunikacije (Las, Rhl i PQS), kao i gena odgovornih za sintezu  
11 fosfolipaze C i sintezu ramnolipida kod izabranih izolata *P. aeruginosa* i soja *P.*  
12 *aeruginosa* PAO1, gajenih u planktonskom obliku i u biofilmu.
- 13 3. Testiranje osetljivosti izabranih izolata *P. aeruginosa* i soja *P. aeruginosa* PAO1 u  
14 planktonskoj formi i njihovih biofilmova na komplekse srebra(I) sa ftalazinom.

15 Shodno ciljevima postavljeni su sledeći zadaci:

- 16 1. Prikupiti dovoljan broj ( $n > 100$ ) izolata *P. aeruginosa* poreklom od obolelih životinja i  
17 ljudi;
- 18 2. Napraviti odabir izolata *P. aeruginosa* na osnovu sposobnosti da formiraju biofilm u  
19 mikrotitracionoj ploči sa 96 bunarčića ravnog dna za dalje analize;
- 20 3. Upporedno analizirati sposobnost odabranih izolata da formiraju biofilm u  
21 mikrotitracionoj ploči, da formiraju biofilm na granici vazduh-tečnost, da proizvode  
22 piocijanin, da se kreću (plivanje, grčenje i rojenje), da ostvare hemolitičku aktivnost,  
23 kao i citotoksični potencijal na ćelijama iz ćelijske linije A549;
- 24 4. Na osnovu rezultata dobijenih analizom citotoksičnog potencijala izolata, odabrati  
25 izolate za ispitivanje njihovog infektivnog potencijala na nematodama *C. elegans* i  
26 embrionima zebrica (*D. rerio*);
- 27 5. Upporedno analizirati ekspresiju odabranih gena kod izabaranih izolata i soja *P.*  
28 *aeruginosa* PAO1 u planktonskoj formi i biofilmu;
- 29 6. Statistički obraditi rezultate dobijene mikrobiološkim i molekularno-genetičkim  
30 metodama;
- 31 7. Testirati osetljivost planktonskih ćelija, kao i biofilmova odabranih izolata *P.*  
32 *aeruginosa* na novosintetisane komplekse srebra(I) sa ftalazinom i ispitati uticaj  
33 kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na pokretljivost i proizvodnju piocijanina kod ovih  
34 izolata.

35  
36 U poglavlju **Materijal i metode**, kandidat predstavlja detalje eksperimentalnog rada.  
37 Metode korišćene u izradi doktorske disertacije su podeljene u grupe prema srodnosti.

#### 38 Materijal

39 U eksperimentima u okviru ove doktorske disertacije korišćena su 202 izolata *P.*  
40 *aeruginosa* dobijena sa Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine  
41 Univerziteta u Beogradu, veterinarske laboratorije „VetLab” iz Beograda i Regionalne bolnice  
42 Valjevo. Od 202 izolata, 121 je bio poreklom iz uzoraka od životinja i to od pasa (109),  
43 mačaka (5), goveda (5), hrčka (1) i zmije (1), a 81 iz uzoraka od ljudi. Prema vrsti uzoraka,  
44 izolati su bili podeljeni na briseve uha (67), urinokulture (38), briseve rana (12), briseve kože  
45 (28), vaginalne briseve (15), briseve oka (7), briseve usta (6), briseve nosa (4), sputum (21) i  
46 uzorke mleka (4). Za izolate poreklom iz bolničkih uzoraka dobijena je dozvola etičke komisije  
47 Regionalne bolnice Valjevo (br. dozvole 01/8570). Kao referentni soj u svim ispitivanjima  
48 korišćen je *P. aeruginosa* PAO1 (NCTC10332) koji je nabavljen iz Nacionalne kolekcije  
49 bakterijskih sojeva (NCTC, *eng.* National Collection of Type Cultures, Ujedinjeno Kraljevstvo).  
50 Izolati su iz pomenutih ustanova preuzimani uz potvrdu da je reč o vrsti *P. aeruginosa*, ali je  
51 po prijemu u laboratoriju još jednom rađena identifikacija mikroskopski, kulturelno i  
52 ispitivanjem fiziološko-biohemijskih osobina izolata. Kao još jedna potvrda identifikacije  
53 odabranih izolata urađena je i identifikacija putem analize parcijalne sekvence gena za 16S  
54 rRNK. Svi izolati *P. aeruginosa* su čuvani u krioprotektivnoj podlozi u zamrzivaču na -70 °C.  
55 Za potrebe eksperimenata bakterijski sojevi su oživljavani i gajeni na Luria Bertani agaru na  
56 37 °C tokom 24 sata.

#### 58 Metode korišćene za karakterizaciju faktora virulencije izolata *P. aeruginosa*

59 Svi izolati su testirani na sposobnost formiranja biofilma u polistirenskim  
60 mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna (Sarstedt, Severna Karolina, SAD) uz

1 bojenje kristal violetom. U bunarčiće su zasejavane suspenzije svakog ispitivanog izolata u  
2 šest ponavljanja. Nakon 24 sata inkubacije na 37 °C formirani biofilmovi su vizuelizovani  
3 bojenjem 0,1% rastvorom kristal-violeta (Serva, Nemačka). Rezultati su očitavani merenjem  
4 apsorbance na talasnoj dužini od 550 nm na spektrofotometru Tecan Infinite 200 Pro  
5 multiplate reader (Tecan Group Ltd., Švajcarska) i predstavljani kao procenat formiranog  
6 biofilma u odnosu na biofilm koji formira soj *P. aeruginosa* PAO1.

7 Ispitivanje sposobnosti odabranih izolata da formiraju biofilm na površini vazduh-  
8 tečnost rađeno je u plastičnim epruvetama (Spektar d.o.o., Srbija). Nakon 24 sata inkubacije  
9 na 37 °C formirani biofilmovi su bojeni kristal violetom (0,1%, v/v). Rezultati su predstavljani  
10 kao procenat biofilma koji formira izolat na granici vazduh-tečnost u odnosu na formirani  
11 biofilm kod soja *P. aeruginosa* PAO1.

12 Ispitivanje različitih tipova pokretljivosti izolata *P. aeruginosa* je rađeno na podlogama  
13 sa različitim procentom agara. Za ispitivanje pokreta plivanja korišćen je polučvrsti agar (0,3%  
14 agara; Torlak, Srbija), za ispitivanje pokreta rojenja korišćen je polučvrsti agar (0,6% agara),  
15 dok je za ispitivanje pokreta grčenja korišćen čvrsti agar (1% agara). Inokulisane podloge su  
16 inkubirane 20 sati kada je reč o ispitivanjima pokreta plivanja i rojenja, odnosno 72 sata na 37  
17 °C, kada je reč o ispitivanju pokreta grčenja. Rezultati su predstavljani kao površina migracije  
18 bakterijskih kolonija na podlogama.

19 Ispitivanje hemolitičke aktivnosti izolata urađeno je u eksperimentima sa ovčijim  
20 eritrocitima (Torlak, Srbija), pri čemu je merena količina oslobođenog hemoglobina iz  
21 razorenih eritrocita. U 1 ml bakterijske suspenzije dodato je 50 µl 1% suspenzije ispranih  
22 eritrocita ovce. Eksperiment je praćen tokom 3 sata na temperaturi od 37 °C. Količina  
23 oslobođenog hemoglobina je određivana merenjem apsorbance upotrebom filtera talasne  
24 dužine od 545 nm na spektrofotometru Ultraspec 3300 pro (Amersham Biosciences,  
25 Ujedinjeno Kraljevstvo). Rezultati su predstavljani kao procenat hemolize u odnosu na totalnu  
26 hemolizu koju izaziva 0,1% triton X-100 (Sigma-Aldrich, Nemačka).

27 Sposobnost izolata da proizvode piocijanin određivana je nakon gajenja bakterijskih  
28 kultura na 37 °C tokom 18 sati, merenjem optičke gustine bakterijskih kultura gajenih na 37  
29 °C i apsorbance supernatanta na spektrofotometru Ultraspec 3300 pro na odgovarajućim  
30 talasnim dužinama. Rezultati su predstavljani kao odnos proizvedenog piocijanina za svaki  
31 izolat u odnosu na piocijanin koji proizvodi soj *P. aeruginosa* PAO1 i izraženi u procentima.

### 32 *Metode korišćene za ispitivanje citotoksičnosti i infektivnosti izolata P. aeruginosa*

34 Za ispitivanje citotoksičnog potencijala ispitivanih izolata u *in vitro* uslovima korišćene  
35 su ćelije karcinoma pluća čoveka iz ćelijske linije A549 (*eng.* American Type Culture  
36 Collection ATCC; Manasas, Virdžinija, SAD). Test se zasnivao na bojenju propidijum jodidom  
37 (PI, Sigma-Aldrich, Nemačka) koji se vezuje za DNK oštećenih ćelija i emituje fluorescentni  
38 signal (ekscitacija/emisija - 493/636 nm). Svi sastojci za održavanje ćelija u laboratoriji  
39 kupljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (Nemačka). Ćelije su gajene u odgovarajućim  
40 tečnim podlogama u plastičnim posudama za gajenje ćelijskih kultura zapremine 75 ml  
41 (Sarstedt, Nemačka) u inkubatoru sa 5% CO<sub>2</sub> i na temperaturi od 37 °C u proseku 2-3 dana.  
42 Za potrebe eksperimenta, ćelije su posle tretmana sa tripsin-EDTA rastvorom  
43 resuspendovane u novoj sterilnoj RPMI podlozi, a broj ćelija je određivan metodom  
44 hemocitometrije (Hausser Scientific, SAD). Eksperiment je izvođen u mikrotitracionim  
45 pločama sa 96 bunarčića ravnog dna za svaki bakterijski izolat u šest istovetnih ponavljanja.  
46 Fluorescenca PI boje je merena na svaka 2 sata (ekscitacija/emisija - 535nm/617nm) u  
47 periodu od 20 sati u aparatu Tecan Infinite 200 Pro multiplate reader. Kao kontrole korišćene  
48 su bakterijske ćelije u RPMI podlozi, kao i ćelije iz ćelijske linije A549 u RPMI podlozi.  
49 Dobijeni rezultati su prikazani kao procenat citotoksičnosti izazvan bakterijskim izolatom u  
50 odnosu na citotoksičnost izazvanu deterdžentom (0,1% Triton-X100), čija je vrednost uzeta  
51 kao 100% citotoksičnost.

52 Ispitivanje infektivnog potencijala odabranih izolata *P. aeruginosa* vršeno je na  
53 nematodi *C. elegans*, soj AU 39 (*glp-4; sek-1*) (*Caenorhabditis elegans* Genetics Center,  
54 Univerzitet u Minesoti, Minesota, SAD). Praćeno je preživljavanje nematoda u periodu od  
55 sedam dana u prisustvu različitih izolata *P. aeruginosa*. Nematode su gajene na podlogama  
56 za rast crva na 15 °C i hranjene sojem *Escherichia coli* OP50 do polaganja dovoljnog broja  
57 jaja. Populacija crva koja je pripremana za eksperiment je sinhronizovana tako da svi crvi  
58 budu u stadijumu larve L4. Eksperiment infektivnosti je rađen u mikrotitracionim pločama sa  
59 96 bunarčića ravnog dna, pri čemu je svaki izolat zasejavan u četiri bunarčića u kojima su se  
60 već nalazili crvi (25-35 crva po bunarčiću). Preživljavanje crva praćeno je u periodu od sedam

1 dana pomoću stereomikroskopa (SMZ143-N2GG, Motic, Nemačka). Crvi koji su imali izgled  
2 rigidnog štapa smatrani su mrtvim. Rezultati su predstavljeni kao procenat preživelih crva u  
3 odnosu na ukupan broj crva i predstavljeni Kaplan-Majerovom krivom preživljavanja.

4 Ispitivanje infektivnog potencijala odabranih izolata ispitano je i na divljem soju  
5 zebrića (*Danio rerio*) (Wellcome Trust Sanger Institute, Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo).  
6 Zebrice su gajene u uzgajalištu za zebrice pod propisanim i kontrolisanim uslovima. Nakon  
7 parenja adultnih ženki i mužjaka, dobijeni embrioni su sakupljeni i isprani od detritusa, a  
8 potom gajeni u vodi za embrione (0,2 g/l Instant Ocean® Salt u destilovanoj vodi) na  
9 temperaturi od 28,5 °C. Na stadijumu razvoja od 24 sata embrionima je pincetom uklonjen  
10 horion i potom su vraćeni u inkubator do trenutka mikroinjektiranja. Embrioni zebrića u  
11 razvojnom stadijumu od 30 sati do 32 sata nakon oplodnje su anestetizirani u rastvoru trikaina  
12 (200 µg/ml, Sigma-Aldrich, SAD), a potom je 2 nl (600 – 650 ćelija) prethodno pripremljenog  
13 bakterijskog inokuluma injektirano u duktus žumancetne kese. Injektiranje je izvedeno  
14 pomoću pneumatske pikopumpe (PV820, World Precious Instruments, SAD). Za ispitivanje  
15 infektivnosti svakog odabranog izolata korišćeno je 25 do 30 embriona. Injektirani embrioni su  
16 gajeni u mikrotitracionim pločama sa 24 bunarčića (u svakom bunarčiću se nalazilo do 10  
17 embriona u 1 ml vode za embrione) na temperaturi od 28,5 °C. Preživljavanje inficiranih  
18 embriona je praćeno naredna četiri dana (do starosti embriona od 120 sati) pomoću  
19 stereomikroskopa, a mrtvi embrioni su uklanjani svaki dan. Tokom četiri dana praćena je  
20 pojava različitih morfo-fizioloških parametara. U cilju praćenja širenja bakterijske infekcije kroz  
21 telo embriona *in vivo*, izolati bakterija su fluorescentno obeležavani inkubiranjem u 10 µM  
22 rastvora boje CellTracker™ Red CMTPX Dye (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific,  
23 SAD). Preživljavanje inficiranih embriona predstavljeno je Kaplan-Majerovom krivom  
24 preživljavanja. Celokupan eksperimentalni rad na modelu zebrića urađen je u skladu sa  
25 Evropskom direktivom (EU2010/63) i prema Pravilniku za rad sa eksperimentalnim  
26 životinjama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u  
27 Beogradu.

#### 28 29 *Analiza biofilмова fluorescentnom mikroskopijom*

30 Metoda fluorescentne mikroskopije je korišćena za posmatranje preživljavanja ćelija  
31 iz ćelijske linije A549 u prisustvu odabranih izolata *P. aeruginosa*, kao i za vizuelizaciju  
32 efekata kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (kompleksi BG1 i BG2) na formiranje biofilмова,  
33 odnosno na degradaciju već formiranih biofilмова. Bakterijski biofilmovi formirani na sloju  
34 ćelija ćelijske linije A549 su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom posle bojenja trima  
35 različitim bojama: SYTO® 9 (TermoFisher Scientific, SAD), DAPI (4',6'-diamidin-2-fenilindol,  
36 TermoFisher Scientific, SAD) i propidijum jodidom (PI, Sigma-Aldrich, Nemačka). Sve tri boje  
37 se vezuju za DNK, s tim da PI ne prolazi kroz intaktnu ćelijsku membranu, pa se koristi kao  
38 indikator vijabilnosti bakterijskih ćelija i ćelija linije A549. Obojeni preparati su posmatrani na  
39 Olympus BX51 fluorescentnom mikroskopu (Olympus, Tokio, Japan). Za potrebe vizuelizacije  
40 efekata kompleksa srebra(I) da inhibira formiranje biofilмова, odnosno na degraduje već  
41 formirane biofilmove, odabrani izolati *P. aeruginosa* su gajeni na plastičnim mikroskopskim  
42 pokrovnim pločicama u prisustvu određene koncentracije kompleksa srebra(I). U ovom  
43 eksperimentu su korišćene već opisane boje PI i SYTO® 9.

#### 44 45 *Analiza aktivnosti puteva međubakterijske komunikacije*

46 U ispitivanju sposobnosti izolata *P. aeruginosa* da proizvode autoinducere za tri  
47 sistema međubakterijske komunikacije (Rhl, Las i PQS) korišćeni su biosenzorski sojevi: *P.*  
48 *aeruginosa* PAOJP2/pKD-rhIA ( $\Delta rhIA PrhIA::lux$ ) – korišćen za merenje količine proizvedenog  
49 autoinducera Rhl sistema, N-butiril-L-homoserin laktona (C4-HSL); *P. aeruginosa* PA14-R3  
50 ( $\Delta lasI PrsA::lux$ ) – korišćen za merenje količine autoinducera Las sistema, N-(3-  
51 oksododekanol)-L-homoserin laktona (3-oxo-C12-HSL); *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta pqsA$  (CTX  
52  $lux::pqsA$ ) – korišćen za merenje količine proizvedenog autoinducera PQS sistema, 2-heptil-  
53 3-hidroksi-4-hinolona. Radi kvantifikacije autoinducera Rhl i Las sistema međubakterijske  
54 komunikacije, supernatant dobijen posle 6 sati gajenja ispitivanih izolata je filtriran  
55 korišćenjem 0,22 µm filtera (Sarstedt, Nemačka) i mešan sa bujonskom kulturom  
56 odgovarajućeg biosenzorskog soja. Za potrebe kvantifikacije autoinducera PQS sistema  
57 međubakterijske komunikacije, bakterije su gajene 24 sata, a autoinduceri su izolovani  
58 razdvajanjem organske i neorganske faze, uparavanjem organske faze, a potom  
59 resuspendovanjem dobijenog taloga u metanolu. Eksperiment je za sve tri vrste autoinducera  
60 rađen u zatamnjanim mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića i ravnim prozirnim dnom

1 (Microtiter plate black chimney well, Greiner, Austrija). Nakon 4 sata inkubacije, optička  
2 gustina i bioluminiscencija su simultano merene na aparatu Tecan Infinite 200 Multiplate  
3 reader. Vrednosti bioluminiscencije su normalizovane prema optičkoj gustini biosenzorskih  
4 sojeva i predstavljene su kao arbitrarne jedinice u odnosu na vrednosti dobijene za soj *P.*  
5 *aeruginosa*.

#### 6 7 *Analiza proizvodnje egzopolisaharida – Congo red agar test*

8 Congo red agar test je korišćen za analizu glavnih strukturnih komponenta matriksa  
9 biofilma: alginata, Pel i Psl egzopolisaharida. Ovaj test je rađen na čvrstoj podlozi uz dodatak  
10 indikatorskih boja, Congo red (MP Biomedicals, LCC, Francuska) i Coomassie brilliant blue  
11 (Sigma-Aldrich, Ujedinjeno Kraljevstvo). Posle inkubacije od 96 sati na temperaturi od 20 °C  
12 posmatrani su izgled i boja kolonija.

#### 13 14 *Molekularno-biološke metode*

15 Odabrani izolati su identifikovani i metodom sekvenciranja gena za 16S rRNK.  
16 Ukupna DNK, koja je korišćena kao matrica za umnožavanje gena za 16S rRNK, je izolovana  
17 iz ispitivanih izolata korišćenjem komercijalnog paketa za izolaciju ukupne DNK - KAPA  
18 Express Extract Kit (Kapa Biosystems, SAD). Umnožavanje gena za 16S rRNK je rađeno u  
19 lančanoj reakciji polimeraze (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR) na aparatu GeneAmp  
20 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD). Svaka PCR reakcija je, prema uputstvu  
21 proizvođača, sadržala potrebne komponente iz KAPA Taq PCR paket (Kapa Biosystems,  
22 SAD), ukupnu DNK kao matricu, kao i univerzalne bakterijske prajmere 27f (5'-  
23 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i 1492r (5'-CGGCTACCTTGTACGACTT-3') (Invitrogen,  
24 Kalifornija, SAD). Za prečišćavanje dobijenih 16S rDNK fragmenata (~1500 bp) korišćen je  
25 QIAquick PCR Purification paket (QIAGEN GmbH, Nemačka), prema uputstvu proizvođača.  
26 Za analizu rezultata izolacije totalne DNK i reakcije lančane polimerizacije korišćena je  
27 horizontalna elektroforeza na agaroznim gelovima (1%, w/v) pripremljenim u TBE puferu uz  
28 dodatak etidijum bromida. Veličina PCR produkta je određivana poređenjem njihove  
29 elektroforetske pokretljivosti sa pokretljivošću standarda poznate molekulske mase -  
30 O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker (100 – 3000 bp; Fermentas UAB, Litvanija). Proizvodi  
31 PCR reakcije su sekvencirani na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,  
32 Kalifornija, SAD), uz upotrebu komercijalnog paketa za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1  
33 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD). Reakciona smeša za sekvenciranje  
34 sadržala je 3,2 pmol 1492r prajmera i PCR proizvod kao DNK matricu (1-2 ng na svakih 100  
35 bp dužine PCR produkta). Proizvod PCR reakcije je potom centrifugiran, ispiran, a talog je  
36 potom osušen, rastvoren u 25 µl formamida (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) i nanešen  
37 na aparat 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD). Analiza kvaliteta dobijenih  
38 sekvenci (~600 bp) rađena je u programu SeqMan pro software (DNASTAR Inc, Vajoming,  
39 SAD). Korišćenjem programa BLAST pretraživane su po sličnosti baze podataka dostupne na  
40 NCBI internet stranici (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Poravnavanje sekvenci izolata sa  
41 sekvencama tipskih sojeva preuzetih iz GenBank baze rađeno je u CLUSTALW2 programu.  
42 Na osnovu dobijenog poravnanja sekvenci konstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem  
43 „neighbor-joining” NJ algoritma uz primenu Jukes-Cantor korekcije u programu MEGA7. Za  
44 ukorenjavanje filogenetskog stabla korišćena je sekvencija gena za 16S rRNK izolata *Bacillus*  
45 *subtilis* B-1 (AB213262.1).

46 Za izolaciju ukupne RNK iz planktonskih bakterijskih ćelija, odnosno bakterijskih ćelija  
47 u okviru biofilma korišćen je komercijalni paket GeneJet RNA purification kit (Thermo  
48 Scientific, Litvanija) po uputstvu proizvođača. Zaostala DNK u RNK smeši je uklanjana  
49 korišćenjem paketa za prečišćavanje RNK, Rapidout DNA removal kit (ThermoFisher  
50 Scientific, Litvanija), prema uputstvu proizvođača. Kvalitet RNK je posle prečišćavanja  
51 proveravan horizontalnom elektroforezom na agaroznim gelu (1%, w/v), a koncentracija je  
52 merena na aparatu NanoVue (GE Healthcare, Ujedinjeno Kraljevstvo). Hemikalije korišćene  
53 za sintezu cDNK nabavljene su od proizvođača Thermo Scientific, a sinteza cDNK je rađena  
54 prema priloženom uputstvu, u dve odvojene reakcije. Prva reakcija, ukupne zapremine od  
55 12,5 µl, sadržala je 0,7 µg RNK matrice, 1 µl nasumičnog prajmera i odgovarajuću količinu  
56 dejonizovane vode i odvijala se 5 minuta na temperaturi od 65 °C, posle čega su uzorci  
57 prebačeni na led i držani na +4 °C 5 minuta. Sadržaju prve reakcije je dodavan reakcioni  
58 pufer, riboblok (40 U/µL), dNTP mešavina (10 mM) i enzim reverzna transkriptaza (200 U/ µl),  
59 tako da se druga reakcija odvijala u ukupnoj zapremini od 20 µl. Ova reakcija se odvijala prvo  
60 na temperaturi od 25 °C 10 minuta, potom na 45 °C 60 minuta i na kraju na 70 °C 10 minuta.

1 Za umnožavanje cDNK metodom Real Time PCR korišćene su hemikalije kupljene od  
 2 proizvođača Thermo Scientific. Reakcije su izvođene u zapremini od 10 µl na aparatu 7500  
 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) prema sledećim parametrima:  
 4 2 minute na 50°C, 10 minuta na 95°C, 40 ciklusa na 95°C 15 sekundi i 60°C 1 minuta. Svaka  
 5 reakcija je rađena u triplikatu, a u eksperiment su kao negativne kontrole bile uključene  
 6 reakcije koje nisu sadržale cDNK matricu. Prajmeri korišćeni za umnožavanje ispitivanih gena  
 7 (Tabela 1) konstruisani su u programu Primer3plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus) na  
 8 osnovu sekvenci gena od interesa kod izolata *P. aeruginosa* deponovanih u bazi podataka.  
 9 Kao referentni gen (gen koji se eksprimira na isti način u svim izolatima) korišćen je gen *rplU*  
 10 koji kodira ribozomalni protein L21. Dužina produkata dobijenih umnožavanjem korišćenih  
 11 prajmera se kretala od 151 do 220 bp (*plcH* – 151 bp; *lasR* – 160 bp; *lasI* – 164 bp; *rhIR* –  
 12 176 bp; *rhII* – 195 bp; *rhIA* – 155 bp; *rplU* – 206 bp; *mucA* – 220 bp; *pelA* – 162 bp; *psIA* – 206  
 13 bp; *pqsA* – 154 bp; *pqsR* – 143 bp). Rezultati su analizirani u programu 7500 System  
 14 Software (Applied Biosystem) i predstavljani kao  $2^{-\Delta Ct}$ , gde je  $\Delta Ct$  razlika između Ct vrednosti  
 15 ispitivanog i referentnog gena.

16  
 17 **Tabela 1.** Spisak prajmera korišćenih za analizu 12 gena kod izolata *P. aeruginosa*

Gen	GenBank oznaka	Oznaka prajmera	5'-3' sekvenca prajmera
<i>plcH</i>	AAG04233.1	PlcH-F PlcH-R	CTATCAACGCAACGGCAAC CAGCCACACTTCACTGATCG
<i>lasR</i>	AAG04819.1	LasR-F LasR-R	TGGATGCTCAAGGACTACGC CCGAGCAGTTGCAGATAACC
<i>lasI</i>	AAG04821.1	LasI-F LasI-R	GCACATCTGGGAACTCAGC TCATCTTCTCCACGCCTACG
<i>rhIR</i>	AAG06865.1	RhIR-F RhIR-R	CTCCTCGGAAATGGTGGTC GCTCGAAGCTGGAGATGTTT
<i>rhII</i>	AAG06864.1	RhII-F RhII-R	CTACCTGTGCAGCGAAACC CCGTTGCGAACGAAATAGC
<i>rhIA</i>	AAG06867.1	RhIA-F RhIA-R	GAAAGCCAGCAACCATCAG AGCTGCCGTTGATGAAATG
<i>rplU</i>	AAG07956.1	rplU-F rplU-R	CGAATTCCTCAAGGTCGAGA GCTTCATGTGGTGCTTACGA
<i>pelA</i>	AAG06452.1	PelA-F PelA-R	TCGATACCTTCGCCCTGAC TGTAATCGCTCATCCACAGC
<i>psIA</i>	AAG05619.1	PsIA-F PsIA-R	CGGTCAGCGAATACAGCTC TTCCTTGGTCAGGAGTACGG
<i>pqsA</i>	AAG04385.1	PqsA - F PqsA - R	CAATACACCTCGGGTTCCAC TGCCATAGCCGAAGAACATC
<i>pqsR</i>	AAG04392.1	PqsR - F PqsR - R	CTGATCTGCCGGTAATTGG ATCGACGAGGAACTGAAGA
<i>mucA</i>	AAG04152.1	MucA-F MucA-F	AACTCTGTCCGCTGTGATGG GTCCCTTCTCCGCTTTCG

18  
 19 **Osetljivost *P. aeruginosa* izolata na komplekse srebra(I)**

20 Svi eksperimenti su rađeni u u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna.  
 21 Ispitivana je osetljivost odabranih izolata *P. aeruginosa* na dva nova kompleksa  
 22 srebra(I) sa ftalazinom, BG1 i BG2, sintetisana na Hemijskom fakultetu Univerziteta u  
 23 Kragujevcu. Antibakterijska aktivnost kompleksa srebra BG1 i BG2 je analizirana  
 24 standardnom mikrodilucionom metodom u bujonu za određivanje minimalne inhibitorne  
 25 koncentracije (MIK) po protokolu Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*eng.* Clinical  
 26 and Laboratory Standards Institute, CLSI).

27 Citotoksični efekat oba jedinjenja na ćelijama iz ćelijske linije fibroblasta pluća –  
 28 MRC5 (*eng.* American Type Culture Collection ATCC; Manasas, Virdžinija, SAD) je ispitivan  
 29 MTT testom koji se zasniva na sposobnosti metabolički aktivnih ćelija da redukuju žuti  
 30 tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid) u ljubičasti formazan,  
 31 koji dalje može biti kvantifikovan spektrofometrijskim metodama. Apsorbanca je merena na  
 32 540 nm na aparatu Tecan Infinite 200 Pro multiplate reader. Dobijeni rezultati su izraženi kao  
 33 procenat vijabilnih ćelija, pri čemu je preživljavanje netretiranih ćelija uzeto kao 100%.

34 Efekat kompleksa srebra(I) na inhibiciju formiranja biofilma odabranih izolata *P.*  
 35 *aeruginosa* je praćen u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića. U bunarčiće na  
 36 mikrotitracionoj ploči dodata je suspenzija bakterija i kompleksi srebra(I) u koncentracijama  
 37 koje su odgovarale vrednostima 0,8×MIK, 0,4×MIK i 0,2×MIK za svako ispitivano jedinjenje i

1 za svaki ispitivani izolat. Rezultati su predstavljeni kao procenat formiranog biofilma pri  
2 inkubaciji sa testiranim kompleksom srebra(I) u odnosu na formirani biofilm kod izolata  
3 inkubiranih bez kompleksa srebra(I). Vrednosti za koje je  $p < 0,05$  u Studentovom t-testu  
4 smatrane su statistički značajnim.

5 Sposobnost kompleksa srebra(I) da degraduje prethodno formirani biofilm je  
6 ispitivana na biofilmovima starim 24 sata. U bunarčiće na mikrotitracionoj ploči dodata je  
7 suspenzija bakterija i kompleksi srebra(I) u koncentracijama koje su odgovarale vrednostima  
8  $2 \times \text{MIK}$ . Rezultati za oba eksperimenta su predstavljeni kao procenat preostalog biofilma pri  
9 inkubaciji sa testiranim kompleksom srebra(I) u odnosu na preostali biofilm kod izolata  
10 inkubiranih bez kompleksa srebra(I). Vrednosti za koje je  $p < 0,05$  u Studentovom t-testu  
11 smatrane su statistički značajnim.

12 Efekat kompleksa srebra(I) na pokretljivost izolata *P. aeruginosa* je praćena na  
13 odgovarajućim podlogama sa dodatim kompleksnim jedinjenima srebra(I) u koncentracijama  
14 koje su odgovarale vrednostima  $0,5 \times \text{MIK}$ . Rezultati su predstavljeni kao procenat smanjene  
15 površine pokretljivosti u odnosu na površinu pokretljivosti kod izolata koji su se kretali po  
16 podlogama bez dodatog kompleksa srebra(I).

17 Efekat kompleksa srebra(I) na proizvodnju piocijanina kod odabranih izolata je praćen  
18 u LB bujonu u koji je dodat kompleks srebra(I) u koncentraciji koja odgovara vrednosti  
19  $0,1 \times \text{MIK}$ . Efekat kompleksa srebra(I) na proizvodnju piocijanina izražen je kao odnos  
20 apsorbance ( $\text{OD}_{695}$ ) supernatanta i optičke gustine pune kulture ( $\text{OD}_{600}$ ) u odnosu na isti  
21 odnos kod kontrolne, netretirane bakterijske kulture.

#### 22 23 *Metode korišćene u statističkoj obradi podataka*

24 U sklopu deskriptivne statistike korišćeni su statistički parametri, kao što su  
25 aritmetička sredina, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost. Za ispitivanje  
26 statistički značajnih razlika između kontrole i tretmana sa kompleksima srebra korišćen je  
27 Studentov t-test, a značajnost je utvrđivana na nivou od  $p < 0,05$ . Za proveru normalnosti  
28 distribucije podataka dobijenih ispitivanjem odabranih faktora virulencije korišćen je Šapiro-  
29 Vilkov test, implementiran u programskom jeziku R u okviru baznog paketa. Za analizu  
30 korelacija korišćena je metoda Robustne rang korelacije implementirana u programskom  
31 paketu R. Korelacioni koeficijenti su određeni pomoću „Gauss strict fuzzy ordering” metode  
32 implementirane u programskom jeziku R u okviru bazičnog paketa. Ispitivane karakteristike  
33 virulencije izolata su smatrane korelisanim ukoliko je koeficijent korelacije bio  $\gamma \geq 0,3$ .  
34 Statistička značajnost vrednosti  $\gamma$  je računata permutacionim testiranjem (10000 permutacije)  
35 u sklopu algoritma Robusne rang korelacije. Kao statistički značajne korelacije uzimane su  
36 korelacije gde je  $p < 0,05$ . Hijerarhijsko grupisanje izolata je izvedeno u programskom jeziku  
37 R u okviru baznog paketa, dok je grafičko predstavljanje hijerarhijskog grupisanja urađeno u  
38 programskom paketu „Dendextend”. Nelinearna regresiona analiza je odabrana za  
39 generisanje modela mašinskog učenja baziranog na sedam nelinearnih predikcionih varijabli  
40 (sedam testiranih faktora virulencije izolata) korišćenih da se odredi citotoksični potencijal  
41 izolata, a predikcioni model je kreiran korišćenjem neparametrijskog algoritma mašinskog  
42 učenja XGBoost (Extreme Gradient Boosting algoritam) implementiranog u programskom  
43 jeziku R u okviru baznog paketa. Za ispitivanje statističke značajnosti razlika između grupa  
44 izolata korišćen je neparametrijski test, Wilcoxon Rank-Sum test implementiran u  
45 programskom jeziku R u okviru baznog paketa, kao i Relative effect test iz „nrmv” R paketa.  
46 Za analiziranje razlika između grupa izolata korišćen je i neparametrijski algoritam mašinskog  
47 učenja XGBoost.

48 Poglavlje **Rezultati** je, shodno postavljenim zadacima istraživanja, podeljeno u  
49 sedam potpoglavlja.

50 U **prvom** potpoglavlju kandidat je prikazao rezultate izolacije, identifikacije i odabira  
51 izolata *P. aeruginosa* na osnovu sposobnosti da formiraju biofilm. Za potrebe ovog ispitivanja  
52 sakupljena su 202 izolata *P. aeruginosa*, od kojih je 121 izolat bio poreklom od životinja, a 81  
53 izolat poreklom od ljudi. Od ukupnog broja analiziranih izolata, osam izolata poreklom od  
54 životinja i tri izolata poreklom od ljudi nije formiralo biofilmove u mikrotitracionim pločama. Na  
55 osnovu sposobnosti da formiraju biofilm, 40 izolata je odabrano za dalju analizu tokom koje  
56 su ispitivani drugi faktori virulencije. Među 40 odabranih izolata, 30 izolata je imalo veću  
57 sposobnost proizvodnje biofilmove u poređenju sa sojem *P. aeruginosa* PAO1, dok je 10  
58 odabranih izolata slabije proizvodilo biofilmove u odnosu na soj *P. aeruginosa* PAO1.

59 U **drugom** potpoglavlju prikazani su rezultati ispitivanja sedam faktora virulencije za  
60 40 izabranih izolata *P. aeruginosa* i referentni soj *P. aeruginosa* PAO1. Pored sposobnosti da



1 formiraju biofilm u mikrotitracionim pločama (ukupan biofilm) i biofilm na površini vazduh-  
2 tečnost, ispitana je sposobnost produkcije piocijanina, hemolitička aktivnost i sposobnost  
3 izolata da manifestuje jedno od tri načina kretanja – plivanje, rojenje i grčenje. Rezultati  
4 analize su pokazali da je 12, odnosno 30% izolata proizvodilo biofilm u količinama dva puta  
5 većim od referentnog soja, dok je sedam izolata (17%) proizvodilo biofilm u količini 20 puta  
6 manjoj od *P. aeruginosa* PAO1. Količina proizvedenog biofilma nije bila povezana sa  
7 poreklom izolata. Najbolji proizvođači biofilma su bili izolati poreklom od životinja, BK6A  
8 (izolovan iz brisa kože psa) i BU31A (izolovan iz brisa uha psa), koji su proizvodili biofilm u  
9 količinama četiri, odnosno pet puta većim od soja *P. aeruginosa* PAO1. Deset izolata (pet  
10 poreklom od ljudi i pet poreklom od životinja) je proizvelo biofilmove na kontaktu vazduha i  
11 tečnosti u količinama većim nego soj *P. aeruginosa* PAO1. Izolati koji su proizveli najveću  
12 količinu biofilma na kontaktu vazduha i tečnosti bili su Bust6A (izolovan iz brisa usta psa) i  
13 BK6A. U proseku, izraženiju hemolitičku aktivnost su pokazali izolati poreklom od ljudi u  
14 odnosu na izolate poreklom od životinja. Najveću hemolitičku aktivnost imalo je pet izolata  
15 poreklom od ljudi, odnosno tri izolata poreklom od životinja. Najveći broj izolata je proizvodio  
16 piocijanin u količinama manjim od referentnog soja *P. aeruginosa* PAO1, pri čemu je  
17 sposobnost proizvodnje piocijanina bila veća među izolatima poreklom od ljudi u poređenju sa  
18 izolatima poreklom od životinja. Dva izolata, BK25H i S25H, su se pokazala kao najveći  
19 proizvođači piocijanina proizvodeći 2,5, odnosno 2,8 puta više pigmenta od referentnog soja  
20 *P. aeruginosa* PAO1. Izolati poreklom od ljudi su se bolje kretali plivanjem i grčenjem u  
21 odnosu na izolate poreklom od životinja. U poređenju sa referentnim sojem *P. aeruginosa*  
22 PAO1, 12 izolata je pokazalo znatno veću pokretljivost plivanjem (četiri izolata poreklom od  
23 životinja i osam izolata poreklom od ljudi). Sposobnost kretanja rojenjem je bila veća među  
24 izolatima poreklom od životinja u poređenju sa izolatima poreklom od ljudi. Izolat Bust3A je  
25 imao čak 30 puta veću zonu pokretljivosti rojenjem od soja *P. aeruginosa* PAO1.

26 U **trećem** potpoglavlju prikazani su rezultati testiranja sposobnosti izolata da izazovu  
27 citotoksični efekat na ćelijama iz ćelijske linije A549, a zatim su rezultati dobijeni u ovom  
28 eksperimentu upoređeni sa rezultatima testiranja infektivnosti, dobijenim u eksperimentima u  
29 model sistemima *Caenorhabditis elegans* i *Danio rerio*. Citotoksična aktivnost ispitivanih  
30 izolata praćena je merenjem fluorescencije boje PI vezane za DNK eukariotskih ćelija sa  
31 narušenim integritetom membrane. Za određivanje citotoksičnosti izolata korišćene su  
32 vrednosti fluorescencije PI izmerene u desetom satu infekcije, kako bi se isključila mogućnost  
33 da detektovani fluorescentni signal potiče od vezivanja PI za ekstracelularnu DNK prisutnu u  
34 biofilmovima. Citotoksičnost kod 60% izolata iz obe grupe je bila veća od citotoksičnosti *P.*  
35 *aeruginosa* PAO1. Među izolatima koji pokazuju dva ili više puta veću citotoksičnost na  
36 ćelijama A549 od referentnog soja, 35% njih su bili poreklom od životinja, odnosno 65% od  
37 ljudi. Za najkarakterističnije izolate, citotoksičnost je praćena i na fluorescentnom mikroskopu 8  
38 sati, odnosno 16 sati po inokulaciji kulture ćelija A549. Izolati za ispitivanja *in vivo* su izabrani  
39 na osnovu rezultata dobijenih za druge faktore virulencije i njihovog citotoksičnog efekta na  
40 ćelijama iz ćelijske linije A549. Smrtnost embriona zebrića, četvrtog dana infekcije se u  
41 zavisnosti od izolata kretala između 23% i 73%. Smrtnost embriona inficiranih sa izolatom  
42 BK25H, koji je proizvodio veliku količinu piocijanina, je već prvog dana bila 55%. Smrtnost  
43 nematoda, četvrtog dana od početka inkubacije sa izolatima *P. aeruginosa* se kretala od 5%  
44 do 72%. Zabeleženo je uginuće od 49% nematoda u prisustvu izolata BK25H, trećeg dana od  
45 početka inkubacije.

46 U **četvrtom** potpoglavlju kandidat je prikazao filogenetsku srodnost odabranih izolata  
47 *P. aeruginosa* utvrđivanu na osnovu parcijalne sekvence gena za 16S rRNK. Na  
48 filogenetskom stablu nije uočeno klasterovanje koje bi ukazalo na filogenetske razlike između  
49 grupa izolata.

50 U **petom** potpoglavlju prikazani su rezultati statističke analize odabranih faktora  
51 virulencije i citotoksičnosti 40 izabranih izolata čiji je cilj bio da se utvrdi korelacioni odnos i  
52 stepen korelacije pojedinačnih faktora virulencije i citotoksičnosti testirane na ćelijama ćelijske  
53 linije A549. Najveća statistički značajna pozitivna korelacija je zabeležena između hemolitičke  
54 aktivnosti i sposobnosti rojenja kod ispitanih izolata, dok je najveća, statistički značajna  
55 negativna korelacija zabeležena između sposobnosti izolata da formiraju A-L biofilm i  
56 sposobnosti rojenja.

57 Odabrani izolati su grupisani metodom hijerarhijskog grupisanja na osnovu podataka  
58 za sedam faktora virulencije i podataka za citotoksičnost. Kod grupisanja izolata kao mera  
59 sličnosti je služila euklidska udaljenost izračunata na osnovu osam ispitivanih virulentnih  
60 karakteristika (sedam faktora virulencije i citotoksičnog potencijala). Dobijeni rezultati,

1 predstavljeni u okviru razgranatog stabla pokazuju da nema jasnog klasterovanja među  
2 izolatima i prema poreklu niti prema karakteristikama virulencije.

3 Primenom mašinskog učenja generisan je predikcioni model citotoksičnosti izolata *P.*  
4 *aeruginosa* koji je pokazao da je najvažnija karakteristika za predikciju citotoksičnosti izolata  
5 *P. aeruginosa* njihova sposobnost da formiraju ukupan biofilm u mikrotitracionim pločama,  
6 dok je sposobnost formiranja biofilma na granici vazduh-tečnost prema ovom modelu  
7 najmanje važna za predikciju citotoksičnosti.

8 Primenom Wilcoxon Rank-Sum testa i Relative effect testa, a na osnovu porekla  
9 izolata, utvrđeno je da najveće razdvajanje između izolata poreklom iz tečnih uzoraka i onih  
10 poreklom iz briseva postoji u sposobnosti proizvodnje A-L biofilma, dok je najveće razdvajanje  
11 između grupa izolata poreklom od životinja u odnosu na one poreklom od ljudi u  
12 citotoksičnosti. Analizom razlika između ispitivanih grupa izolata, metodom mašinskog učenja  
13 dobijeno je da konstruisani model, na osnovu korišćenih podataka bolje razdvaja izolate na  
14 osnovu vrste uzorka (iz brisa/iz tečnosti) nego na osnovu porekla (od životinja/od čoveka).

15 U **šestom** potpoglavlju prikazani su rezultati analize ekspresije 11 gena čiji su  
16 proizvodi uključeni u proces formiranja biofilma, međubakterijsku komunikaciju, hemolitičku  
17 aktivnost, kao i proizvodnju ramnolipida. Za ovu analizu odabrana su tri izolata *P. aeruginosa*  
18 na osnovu razlika u sposobnosti da formiraju biofilmove u odnosu na soj PAO1. Rezultati su  
19 prikazani kao relativne vrednosti ekspresije gena u odnosu na soj PAO1. Prvo je u Congo red  
20 testu pokazana razlika u izgledu i boji kolonija, što je ukazivalo na različit odnos pojedinih  
21 polisaharidnih komponenata koje su ispitivani izolati proizvodili. Analiza ekspresije gena koji  
22 kodiraju strukturne komponente matriksa biofilma ukazala je na viši nivo ekspresije *pelA* gena  
23 u planktonskoj formi kod svih testiranih izolata u odnosu na soj PAO1. S druge strane, nivoi  
24 ekspresije ovog gena u biofilmovima sva tri izolata bili su niži u odnosu na PAO1. Ekspresija  
25 *psIA* gena značajno je varirala među izolatima, kao i među različitim formama rasta istog  
26 izolata. Izolati BU31A i BK25H, koje karakteriše veća proizvodnja biofilma u odnosu na  
27 referentni soj, pokazali su značajno manju ekspresiju *psIA* gena u formi planktonskih ćelija.  
28 Kod izolata BR2A koji je proizvodio biofilm u znatno manjoj količini od referentnog soja,  
29 ekspresija ovog gena u planktonskoj formi je bila pet puta veća u odnosu na *P. aeruginosa*  
30 PAO1. Ekspresija *mucA* gena kod izolata BU31A koji se pokazao kao najbolji proizvođač  
31 biofilma nije se značajno razlikovala od ekspresije kod *P. aeruginosa* PAO1.

32 Ekspresija *rhlA* gena uključenog u sintezu ramnoziltransferaze je bila 90 puta veća u  
33 biofilmu izolata BR2A u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, što odgovara maloj količini biofilma  
34 koju ovaj izolat proizvodi. Nije bilo značajnih razlika u ekspresiji *plcH* gena među ispitanim  
35 izolatima gajenim u planktonskoj formi, dok je u formi biofilma izolat BU31A pokazao četiri  
36 puta manju ekspresiju ovog gena u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1.

37 Kvantifikacijom autoinducera u supernatantima izabranih izolata utvrđeno je da najbolji  
38 proizvođač biofilma izolat BU31A u stacionarnoj fazi rasta proizvodi deset puta manju količinu  
39 sve tri vrste signalnih molekula u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, ali i na druga dva  
40 analizirana izolata. Dok je izolat BK25H proizvodio malu količinu C4-HSL, količina 3-oxo-C12-  
41 HSL je bila značajno viša u odnosu na referentni soj. Proizvodnja autoinducera PQS sistema  
42 kod ovog izolata bila je slična kao kod referentnog soja. Najmanji proizvođač biofilma, BR2A,  
43 proizvodio je značajno veću količinu 3-oxo-C12-HSL u odnosu na referentni soj, dok mu je  
44 proizvodnja C4-HSL i PQS bila značajno manja.

45 Rezultati analize ekspresije gena koji kodiraju komponente signalnih puteva  
46 međubakterijske komunikacije pokazali su visoku ekspresiju PQS signalnog puta u biofilmu  
47 izolata BU31A, najboljeg proizvođača biofilma među testiranim izolatima. Kod izolata BR2A  
48 koji je proizvodio male količine biofilma u odnosu na PAO1, ekspresija sintetaza i receptora  
49 sva tri signalna puta bili su značajno više ekspimirani kako u planktonskoj, tako i u biofilm  
50 formi.

51 U **sedmom** potpoglavlju prikazani su rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *P.*  
52 *aeruginosa* na dva novosintetisana kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2).  
53 Koncentracija kompleksa BG1 koja je smanjila vijabilnost ćelija fibroblasta za 50% je bila  $18 \pm 1,03$   $\mu\text{g/ml}$ , dok je za kompleks BG2 ta vrednost iznosila  $8,9 \pm 0,77$   $\mu\text{g/ml}$ . Antibakterijski  
54 potencijal oba kompleksa testiran je na 15 izabranih izolata *P. aeruginosa* i na referentnom  
55 soju *P. aeruginosa* PAO1. Kompleksi srebra(I) uspešno su inhibirali rast planktonskih oblika  
56 izolata *P. aeruginosa* sa MIK koncentracijama u opsegu od 2,5 do 25  $\mu\text{g/ml}$ . U subinhibitornim  
57 koncentracijama pokazali su umereno inhibitorno dejstvo na formiranje biofilmova. S druge  
58 strane, utvrđeno je da su kompleksi bili efikasni u degradovanju već formiranih biofilmova pri  
59 koncentracijama dva puta većim od vrednosti MIK, smanjujući biomasu biofilmova i do 90%.

1 Uticaj kompleksa srebra(I) prikazan je i na fluorescentnim mikrografijama, gde se uočava  
2 smanjenje biomase biofilмова i povećanje broja mrtvih bakterija usled tretmana. Kompleksi  
3 srebra(I) su pokazali najveći efekat na pokretljivost *P. aeruginosa* PAO1 i nisu uticali na  
4 proizvodnju piocijanina ni kod izolata BK25H, ni kod referentnog soja.

5 U poglavlju **Diskusija** kandidat je detaljno analizirao dobijene rezultate i dao kritički  
6 osvrt upoređujući ih sa rezultatima drugih istraživanja prikazanim u navedenoj literaturi.

7 U poglavlju **Spisak literature** kandidat je naveo 287 referenci koje je koristio tokom  
8 izrade svoje doktorske disertacije.

## 10 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 11 disertaciji):

- 13 1. Od 202 ispitana izolata *P. aeruginosa*, gotovo svi izolati poreklom od životinja (93%),  
14 odnosno poreklom od ljudi (96%) su imali sposobnost da proizvode biofilmove u  
15 mikrotitracionim pločama.
- 16 2. Korelacije između sedam ispitivanih faktora virulencije i citotoksičnog efekta kod  
17 odabranih izolata (30 izolata koji su proizvodili biofilm u količinama većim od PAO1 i  
18 10 izolata koji su proizvodili biofilm u količinama znatno manjim od PAO1), utvrđene  
19 neparametrijskom statističkom analizom, iako nisu bile velike, bile su statistički  
20 značajne. Najveća pozitivna korelacija uočena je između hemolitičke aktivnosti i  
21 pokreta rojenja, dok je najveća negativna korelacija uočena između sposobnosti  
22 formiranja biofilma na granici vazduh-tečnost i pokreta rojenja.
- 23 3. Hijerarhijskim klasterovanjem nije uočeno grupisanje izolata ni po poreklu ni po  
24 karakteristikama virulencije, kao ni u filogenetskoj analizi parcijalne sekvence gena za  
25 16S rRNK.
- 26 4. Prediktivni model koji je konstruisan primenom metode mašinskog učenja je od  
27 sedam analiziranih karakteristika virulencije izdvojio sposobnost formiranja biofilma  
28 kao važan faktor u predikciji citotoksičnosti izolata *P. aeruginosa*.
- 29 5. Na osnovu rezultata Wilcoxon Rank-Sum testa i Relative effect testa, zaključeno je  
30 da najveće razdvajanje između izolata poreklom iz tečnih uzoraka i onih poreklom iz  
31 briseva postoji u sposobnosti proizvodnje A-L biofilma - veću sposobnost proizvodnje  
32 A-L biofilma imaju izolati izolovani iz tečnih uzoraka. S druge strane, razdvajanje  
33 između izolata poreklom od životinja u odnosu na one poreklom od ljudi je najveće na  
34 osnovu citotoksičnog efekta - veću citotoksičnost pokazuju izolati poreklom od ljudi.
- 35 6. Pod ispitivanim uslovima, piocijanin je bio najznačajniji faktor virulencije u izazivanju  
36 letalnog efekta kod nematoda *Caenorhabditis elegans* AU 39, odnosno embriona  
37 ribica *Danio rerio*.
- 38 7. Analizom ekspresije gena koji kodiraju strukturne komponente matriksa biofilma  
39 uočen je viši nivo ekspresije *pelA* gena u formi planktonskih ćelija testiranih izolata,  
40 što koincidira sa važnošću Pel polisaharida za inicijalnu fazu formiranja biofilma. S  
41 druge strane, veća ekspresija *psIA* gena kod ispitivanih izolata zabeležena je kada su  
42 oni gajeni u formi biofilma, što ukazuje na značaj ovog egzopolisaharida u  
43 ekstracelularnom matriksu zrelih biofilмова.
- 44 8. Mala sposobnost izolata da formira biofilm bila je povezana sa povećanjem aktivnosti  
45 Rhl signalnog puta međubakterijske komunikacije, kao i povećanom ekspresijom *rhlA*  
46 gena.
- 47 9. Iako su procesi povezani sa formiranjem biofilma regulisani signalnim putevima  
48 međubakterijske komunikacije, sposobnost izolata da formiraju biofilm ne mora da  
49 bude direktno povezana sa količinom proizvedenih autoinducera za tri glavna  
50 signalna puta kod vrste *P. aeruginosa*.
- 51 10. Kompleksi srebra(I) sa ftalazinom uspešno su inhibirali rast planktonskih oblika  
52 izolata *P. aeruginosa* u koncentracijama od 2,5 do 25 µg/ml, dok su u subinhibitornim  
53 koncentracijama pokazali umereno inhibitorno dejstvo na formiranje biofilмова.  
54 Kompleksi su posebno bili efikasni u degradovanju već formiranih biofilмова (do  
55 90%), pri koncentracijama dva puta višim od vrednosti MIK. Kompleksi srebra(I) sa  
56 ftalazinom su bili umereno efikasni u inhibiciji pokretljivosti *P. aeruginosa* i nisu uticali  
57 na proizvodnju piocijanina.

1 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**  
2 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**  
3 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**  
4

5 Predstavljanje i tumačenje dobijenih rezultata je u skladu sa postavljenim ciljevima i  
6 zadacima istraživanja. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno, grafički i uz pomoć slika, a  
7 njihov opis je dat logičnim redosledom, pregledno, jasnim i razumljivim stilom. Jasno  
8 formulisani zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata.  
9

10 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**  
11

12 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**  
13

14 Doktorska disertacija kandidata Dušana Milivojevića pod naslovom „Ispitivanje  
15 odabranih faktora virulencije kod izolata *Pseudomonas aeruginosa* i njihova osetljivost na  
16 komplekse srebra” je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.  
17

18 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**  
19

20 Doktorska disertacija kandidata Dušana Milivojevića pod naslovom „Ispitivanje  
21 odabranih faktora virulencije kod izolata *Pseudomonas aeruginosa* i njihova osetljivost na  
22 komplekse srebra” sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju.  
23

24 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci**  
25

26 S obzirom na medicinski značaj koji ima oportunistički patogen *Pseudomonas*  
27 *aeruginosa*, iznenađujuće su malobrojna istraživanja koja se bave utvrđivanjem značaja  
28 pojedinih faktora virulencije za proces uspostavljanja infekcija izazvanih ovom bakterijom kod  
29 ljudi i životinja. Istraživanja ove vrste su uglavnom fokusirana na jednu vrstu uzoraka  
30 izolovanih iz jednog domaćina, najčešće čoveka, dok su istraživanja na izolatima iz životinja  
31 retka i manje opsežna. Ovaj rad je prva uporedna analiza odabranih faktora virulencije izolata  
32 *P. aeruginosa* dobijenih iz različitih vrsta uzoraka poreklom od životinja i ljudi u Republici  
33 Srbiji. Poznato je da je ekspresija gena odgovornih za ispoljavanje virulencije različita u  
34 planktonskoj formi i kod biofilmova, ali do sada nije analizirano da li postoje razlike u  
35 ekspresiji gena u istoj fazi rasta kod izolata koji pokazuju razlike u fenotipu virulencije i kako  
36 ove razlike utiču na njihov patogeni potencijal. Rezultati ove studije pružaju uvid u povezanost  
37 determinanti virulencije i patogenosti *P. aeruginosa* na ćelijskom i molekularnom nivou.

38 Zbog sve učestalije pojave sojeva *P. aeruginosa* rezistentnih na jednu ili više vrsta  
39 antibiotika udružene sa tolerancijom koja ovoj bakteriji obezbeđuje forma biofilma, *P.*  
40 *aeruginosa* je svrstan u kritičnu grupu patogena za koje je neophodno pronaći i uvesti nove  
41 lekove. U ovoj doktorskoj disertaciji je testirana efikasnost novosintetisanih kompleksa srebra  
42 u inhibiciji planktonskog oblika i biofilmova izolata *P. aeruginosa* različitog patogenog  
43 potencijala i rezultati pokazuju da oba kompleksa efikasno inhibiraju rast i razaraju formirane  
44 biofilmove, čak i kod izolata koji su dobri produceri biofilmova. Značaj ovog istraživanja je što  
45 ukazuje na obećavajući terapijski potencijal testiranih kompleksa srebra, ne samo u  
46 akutnim, već i u hroničnim infekcijama izazvanim biofilm-produkujućim sojevima *P.*  
47 *aeruginosa*.  
48

49 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**  
50 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**  
51 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**  
52 **rada, naziv časopisa, imapkt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**  
53 **vrednovanja i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**  
54

55 **Milivojevic Dusan**, Sumonja Neven, Medic Strahinja, Pavic Aleksandar, Moric Ivana,  
56 Vasiljevic Branka, Senerovic Lidija, Nikodinovic-Runic Jasmina (2018). **Biofilm forming**  
57 **ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from**  
58 **animals and humans**. Pathogens and Disease, 76, fty041; doi: 10.1093/femspd/fty041  
59 **IF<sub>2017</sub> 2,337 (M22)**  
60

1 X PREDLOG:

2  
3 Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri  
4 ponuđenih mogućnosti):

5 - da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana

6 - da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu

7 - da se doktorska disertacija odbije

8  
9  
10  
11  
12 DATUM  
13 15.08.2018. godine

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  

---

Dr Dušan Mišić, vanredni profesor,  
Fakultet veterinarske medicine  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Lidija Šenerović, viši naučni saradnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Marina Radojičić, vanredni profesor,  
Fakultet veterinarske medicine  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Ivana Morić, viši naučni saradnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Jelena Ašanin, naučni saradnik,  
Inovacioni centar Tehnološko – metalurškog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu