

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

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 15.06.2021. године, прихваћен је извештај ментора др Биљане Николић о урађеној докторској дисертацији Стефане Д. Цветковић, асистента на Катедри за микробиологију Института за ботанику и Ботаничке баште „Јевремовац“, Универзитета у Београду – Биолошког факултета, под називом „**Антимикробни и антигенотоксични ефекат екстраката линцуре (*Gentiana lutea* L.) гајене у плантажним и лабораторијским условима**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Биљана Николић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Бранислав Настасијевић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „ВИНЧА“, Институт од националног значаја за Републику Србију, др Слађана Тодоровић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, др Бранка Вуковић-Гачић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет и др Драгана Митић-Ђулафић, научни саветник, 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. Цветковић, под називом „**Антимикробни и антигенотоксични ефекат екстраката линцуре (*Gentiana lutea* L.) гајене у плантажним и лабораторијским условима**“, представља истраживање произашло из вишегодишњег испитивања антимикробног и антигенотоксичног потенцијала екстраката *Gentiana lutea*, добијених од биљака гајених на комерцијалним плантажама и у *in vitro* лабораторијским

условима. Истраживање је нарочито стимулисано потребом за проналажењем нових антимикробних агенаса природног порекла са потенцијалом у презервацији хране, као и природних једињења способних да редукују оштећења на молекулу ДНК насталих излагањем различитим хемијским и физичким мутагенима. Ова докторска дисертација је урађена на Катедри за микробиологију, Универзитета у Београду – Биолошког факултета, у Лабораторији за физичку хемију, Универзитета у Београду – Института за нуклеарне науке „ВИНЧА“, Института од националног значаја за Републику Србију, на Одељењу за физиологију биљака, Универзитета у Београду – Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију, на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, као и на Катедри за технолошку микробиологију, Универзитета у Београду – Пољопривредног факултета. Истраживања ове докторске дисертације су реализована у оквиру пројекта „Биолошки активни природни производи као потенцијални извори нових лекова и дијететских суплемената“, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ОИ 172058, 2011-2019. године).

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 131 страни и подељена је на осам поглавља: Увод (22 стране), Циљеви истраживања (2 стране), Материјал и методе (24 стране), Резултати (41 страна), Дискусија (14 страна), Закључци (2 стране), Литература (17 страна) и Прилози (9 страна). Докторска дисертација садржи 44 слике, 27 табела и 277 библиографских јединица. 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 релевантне литературне податке који су од значаја за разумевање теме докторске дисертације. У потпоглављу „Присуство микроорганизама у храни и проблеми резистенције на конвенционалне антимикробне агенсе“ јасно су описани проблеми присуства микроорганизама у намирницама, као и последице њиховог размножавања по здравље људи. Дат је приказ најчешћих патогена и узрочника кварења хране, као и болести до којих долази код конзументата услед уноса

контаминираних хране. Додатно, овај део дисертације објашњава проблем све веће отпорности бактерија на конвенционалне начине конзервације хране и штетне последице комерцијалних вештачких адитива хране. У оквиру овог потпоглавља налазе се два поднаслова: „Механизми резистенције бактерија“ и „Формирања биофилма и начини његове превенције у прехранбеној индустрији“. У оквиру првог поднаслова, концизно су објашњени механизми деловања антимикробних супстанци, као и механизми којима се остварује резистенција бактерија. Други поднаслов се бави дефинисањем појма биофилма и фазама његовог настанка, као и проблемима услед његовог формирања у прехранбеној индустрији. Акцент је стављен на проблем формирања биофилма *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*, који представљају честе опортунистичке патогене хране.

У оквиру потпоглавља „Генотоксикологија – штетне последице генотоксина и значај тестирања генотоксичности/антигенотоксичности“ јасно је дефинисан појам генотоксичности, као и генотоксина, и дата је њихова подела према пореклу и начину деловања. Објашњен је и значај проналаска нових једињења која поседују антигенотоксични потенцијал, односно способна су да редукују штетне последице генотоксина. Ово потпоглавље је подељено на два поднаслова: „Мутагени из хране“ и „УВ зрачење као извор оштећења на ДНК молекулу“. Први поднаслов даје опште информације о настанку мутагена током термичке обраде хране и начину њиховог деловања, као и штетним последицама које узрокују на молекулу ДНК. У оквиру овог дела се налази и целина „Хетероциклични ароматични амини“, која детаљније даје информације о овој групи мутагених једињења, пре свега о механизмима настанка током температурне обраде хране, као и механизмима њихове метаболичке активације у организму и деловања на ДНК молекулу, са посебним акцентом на IQ и PhIP мутагене. У оквиру другог поднаслова („УВ зрачење као извор оштећења на ДНК молекулу“) дате су опште информације о ултраљубичастом зрачењу, подели на основу таласних дужина, као и о штетним последицама зрачења које су све израженије услед све веће деградације озонског омотача и повећања УВ индекса. Објашњене су и најчешће промене које се дешавају на ДНК молекулу услед излагања различитим спектрима УВ зрачења, док су детаљни механизми настанка оштећења описани у целини „Механизми УВ-индукованих оштећења“

Узимајући у обзир чињеницу да се протективна улога антигенотоксичних супстанци често заснива на њиховим антиоксидативним способностима, у трећем потпоглављу „Протективна улога антиоксиданата“ су најпре дефинисани слободни радикали и начини њиховог настанка, а затим су објашњени механизми протективног деловања антиоксиданата.

С обзиром на све већу примену биљака у фармаколошким истраживањима, са циљем проналаска природних антимикуробних и антигенотоксичних једињења, у следећем потпоглављу „Биљке као извор биолошки активних компоненти“ дат је најпре краћи историјски преглед употребе биљака у традиционалној медицини, као и информације о секундарним метаболитима биљака и њиховим најчешћим биолошким активностима. Детаљнији подаци који поткрепљују примену биљака као потенцијалних антимикуробних и антигенотоксичних агенаса су дати у поднасловима: „Биљке као извор антимикуробних једињења“ и „Биљке као извор антигенотоксичних једињења“.

У оквиру последњег потпоглавља „Опште одлике рода *Gentiana*“ описана је географска распрострањеност рода, традиционална употреба биљака овог рода у медицинске сврхе и истакнуте су најзаступљеније групе биолошки активних компоненти и њихове фармаколошке активности. У оквиру овог потпоглавља налазе се два подналова: „*Gentiana lutea* – опште карактеристике“ и „Проблем угрожености *G. lutea* и алтернативна решења“. Први поднаслов даје информације о распрострањености *G. lutea*, морфолошким карактеристикама, као и коришћењу осушеног корена линцуре као званичног лека у европској фармакопеји. Додатно, дати су и подаци о приносу главних фармаколошки активних компоненти у корену и у надземним деловима линцуре, као и о многобројним биолошким активностима ове биљке доказаним до данас. Други поднаслов описује проблем угрожености линцуре на свом природном станишту услед прекомерне експлоатације и даје податке о алтернативном решењу снабдевања светског тржишта овим биљним материјалом. Објашњене су предности и мане плантажног гајења *G. lutea*, као и потенцијал гајења у *in vitro* култури, ради добијања здравог биљног материјала за рекултивацију врсте и фитохемијска истраживања.

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

- 1) Припрема и хемијска анализа 50% водено-етанолних и метанолних екстраката *G. lutea*;
- 2) Испитивање антимикуробног потенцијала екстраката и одабраних конституената линцуре према бактеријама контаминентима хране;
- 3) Анализа антигенотоксичног ефекта екстраката и одабраних конституената линцуре према мутагенима из хране;
- 4) Анализа антигенотоксичног ефекта екстраката линцуре према УВ зрачењу;
- 5) Испитивање улоге механизма антиоксидативне заштите у ученој антигенотоксичности.

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

- Припрему биљних екстраката, која је обухватила успостављање *in vitro* културе и екстракцију плантажног и *in vitro* биљног материјала 100% метанолом, односно плантажног материјала 50% водено-етанолним раствором,
- Хемијску карактеризацију екстраката, која је подразумевала одређивање квантитативног и квалитативног садржаја екстраката, као и садржаја укупних полифенола и флавоноида,
- Испитивање антимикуробног ефекта екстраката и конституената *G. lutea* према одабраним бактеријским сојевима, које је обухватило одређивање минималних инхибиторних и минималних бактерицидних концентрација, као и анализу утицаја на формирање биофилма,
- Анализу антигенотоксичног потенцијала екстраката и одабраних конституената линцуре према 2-амино-3-метилимидазо[4,5-f]хинолин (IQ) и 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо [4,5-b]пиридин (PhIP) мутагенима, применом SOS/*umuC* testa на *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK 1002 и алкалног комет теста на ћелијама јетре HepG2,
- Анализу антигенотоксичног потенцијала екстраката линцуре према УВЦ и УВА зрачењу, применом алкалног комет теста на нормалним фибробластима (MRC-5 ћелије) и ћелијама меланома (Hs 294Т линија),
- Испитивање улоге антиоксидативне заштите у уоченој антигенотоксичности, применом DPPH, TBA, FRAP, CUPRAC тестова и теста хелирања јона гвожђа, затим праћењем утицаја одабраних екстраката и конституената на експресију Nrf2 транскрипционог фактора на HepG2 ћелијама, као и испитивањем утицаја појединачних третмана одабраних екстраката, конституената и мутагена и њихових ко-третмана на однос редукованог и оксидованог глутатиона у HepG2 ћелијама.

Поглавље **Материјал и методе** подељено је на два потпоглавља. У потпоглављу „**Материјал**“ наведени су: 1) биљни материјал коришћен за прављење екстраката; 2) чиста једињења коришћена приликом хемијске анализе и испитивања одређених биолошких активности; 3) раствори коришћени у тестовима антиоксидативности; 4) биолошки материјал у оквиру кога су описани бактеријски сојеви и ћелијске линије коришћене у раду; 5) хранљиве подлоге и раствори за рад са бактеријским културама; 6) хранљиве подлоге и раствори за рад са хуманим ћелијским линијама; 7) прајмери за qRT-PCR; 8) комерцијални кит за одређивање односа редукованог и оксидованог глутатиона; 9) мутагени из хране и модел мутагени.

Друго потпоглавље („**Методе**“) даје детаљне информације о методама коришћеним за прављење биљних екстраката, њихову хемијску карактеризацију, одређивање антиоксидативног

потенцијала, испитивање антимикуробног потенцијала, анализу антигенотоксичности. Одељак „Гајење биљака и припрема екстраката“ садржи два пододељка у којима је дат опис успостављања *in vitro* културе и припрема екстраката плантажно и *in vitro* гајене линцуре. У оквиру следећег одељка „Хемијска карактеризација екстраката“ налазе се такође два пододељка у којима се најпре објашњава квалитативна и квантитативна анализа екстраката линцуре (UPLC-PDA MS/MS), а затим колориметријске методе за одређивање укупног садржаја полифенола и флавоноида. Одељак „Детекција антиоксидативне активности“ садржи неколико пододељака у којима су описане спектрофотометријске методе за одређивање антиоксидативног потенцијала применом DPPH теста за одређивање способности неутрализације DPPH радикала, TBA теста за одређивање способности инхибиције липидне пероксидације, теста хелирања јона гвожђа, FRAP и CUPRAC тестова за одређивање редукционог капацитета. У одељку „Испитивање биолошких активности на бактеријским модел системима“ најпре су у оквиру првог пододељка дате информације о гајењу и припреми бактеријских култура за рад. Затим је у следећем пододељку детаљно описан протокол микродилуционог теста којим је испитан антимикуробни потенцијал деривата линцуре према одабраним сојевима. Даље, у наредном пододељку описан је поступак за испитивање утицаја екстраката и конституената линцуре на процес формирања биофилма одабраних бактеријских сојева. Други део одељка „Испитивање биолошких активности на бактеријским модел системима“ у пододељцима објашњава SOS/*umuC* тест на *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK 1002, којим је испитиван генотоксични ефекат екстраката *G. lutea* и мутагена IQ и PhIP, као и антигенотоксични потенцијал екстраката према датим мутагенима. У оквиру одељка „Испитивање биолошких активности на култури сисарских ћелија“, најпре су у пододељку „Методе за одржавање и гајење ћелијских линија“ описани поступци за замрзавање, оживљавање и гајење, трипсинизацију и одређивања броја ћелија методом бојења трипан плавим. У наредном пододељку „Одређивање нецитотоксичних концентрација тест супстанци применом МТТ теста“, описан је МТТ тест коришћен за испитивање ефекта тест супстанци на ћелијама хепатоцелуларног карцинома (HepG2), нормалним феталним фибробластима плућа (MRC-5) и ћелијама меланома (Hs 294T), а у циљу детектовања нетоксичних доза које су даље примењене за испитивање генотоксичности. Следећи пододељак („Испитивање генотоксичности применом алкалног комет теста“) даје детаљне информације о припреми ћелијских линија за испитивање генотоксичности, затим о успостављању нелеталних генотоксичних доза УВЦ и УВА зрачења, као и о радном протоколу алкалног комет теста. У пододељку „Испитивање антигенотоксичности применом алкалног комет теста“ описана је процедура за одређивање антигенотоксичног потенцијала екстраката и конституената линцуре према IQ и PhIP

мутагенима на НерG2 ћелијама, као и УВ-протективног ефекта екстраката на MRC-5 и Hs 294T ћелијама. Даље, изолација РНК молекула и процедура qRT-PCR методе примењене за праћење утицаја екстраката/конституената линцуре на експресију Nrf2 транскрипционог фактора на НерG2 ћелијама су описани у пододељку „Праћење експресије Nrf2 транскрипционог фактора квантитативном RT-PCR методом (qRT-PCR)“. У последњем пододељку („Одређивање садржаја и односа редукованог и оксидованог глутатиона“) дати су подаци о припреми и третману НерG2 ћелија тест супстанцама и објашњен је поступак за одређивање садржаја и рачунања односа редукованог и оксидованог глутатиона. 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 6 потпоглавља: 1) *In vitro* гајење *G. lutea*; 2) Хемијска карактеризација екстраката *G. lutea*; 3) Антибактеријска активност екстраката *G. lutea* и њених конституената; 4) Испитивање антигенотоксичног ефекта екстраката *G. lutea* према IQ и PhIP мутагенима; 5) Испитивање антигенотоксичног ефекта екстраката *G. lutea* према УВ зрачењу; 6) Испитивање антиоксидативног потенцијала екстраката *G. lutea*. Најпре су у првом потпоглављу приказани параметри *in vitro* раста и морфогенезе *G. lutea*, који су указали на успешно успостављање *in vitro* културе. У другом потпоглављу, у оквиру одељка „UPLC-PDA MS/MS анализа екстраката“ дати су резултати квантитативне и квалитативне анализе екстраката линцуре табеларно, са процентима заступљености главних конституената. Затим следи одељак у коме су приказани резултати садржаја укупних полифенола и флавоноида у екстрактима, при чему је већи принос ових једињења забележен у екстрактима пореклом од надземних делова биљке.

У оквиру трећег потпоглавља, приказани су резултати антибактеријске активности екстраката и конституената линцуре. Најпре су представљени резултати микродилуционе методе (одељак „Одређивање минималних инхибиторних и бактерицидних концентрација екстраката и конституената *G. lutea*“), који истичу већу осетљивост грам позитивних бактерија, при чему су најосетљивије на деловање екстраката биле *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Enterococcus faecalis*, док су конституенти били најнефикаснији према *L. monocytogenes*. Затим су представљени резултати утицаја екстраката на формирање биофилма *S. aureus* и *L. monocytogenes* (одељак „Ефекат екстраката и конституената *G. lutea* на формирање биофилма одабраних сојева“), који су указали на јаку способност екстраката листова плантажно гајене линцуре да спречавају формирање биофилма *L. monocytogenes*. У оквиру истог одељка су

и резултати утицаја одабраних конституената на формирање биофилма *L. monocytogenes*, који показују да хомоориентин и мангиферин испољавају најизраженију антибиофилм активност.

Четврто потпоглавље обухвата резултате испитивања антигенотоксичног потенцијала екстраката и конституената линцуре према мутагенима из хране на прокариотском и еукариотском тест систему. Најпре су у оквиру одељка „Испитивање антигенотоксичног ефекта екстраката *G. lutea* у SOS/*umuC* тесту“ одређене нецитотоксичне концентрације тест супстанци на *S. typhimurium*, применом микродилуционе методе, а одсуство токсичности је додатно потврђено одређивањем стопе раста бактерије у SOS/*umuC* тесту (поделељак „Одређивање нецитотоксичних концентрација тест супстанци на *S. typhimurium* TA1535 соју“). Затим је испитана генотоксичност тест супстанци, у одсуству и присуству метаболичке активације. Наиме, одређене су стопе индукције оштећења на ДНК које су указале на промутагени ефекат екстраката линцуре на већим примењеним концентрацијама и потврдиле генотоксичност PhIP мутагена (поделељак „Процена генотоксичности тест супстанци у SOS/*umuC* тесту“). Након одређивања негенотоксичних концентрација екстраката и генотоксичне дозе PhIP мутагена, испитана је антигенотоксичност екстраката према тестираном мутагену, при чему су сви екстракти испољили висок генопротективни ефекат (поделељак „Процена антигенотоксичног ефекта екстраката *G. lutea* према PhIP мутагену у SOS/*umuC* тесту“). У одељку „Испитивање антигенотоксичног ефекта екстраката *G. lutea* применом алкалног комет теста“ приказани су најпре резултати МТТ теста на НерG2 ћелијама, којима су одређене нецитотоксичне концентрације екстраката, конституената и мутагена (поделељак „Одређивање нецитотоксичних концентрација тест супстанци на НерG2 ћелијама применом МТТ теста“), а затим су применом алкалног комет теста одређене негенотоксичне дозе екстраката и конституената, односно генотоксичне концентрације IQ и PhIP мутагена (поделељак „Процена генотоксичног потенцијала тест супстанци на НерG2 ћелијама применом алкалног комет теста“). На крају овог одељка приказани су резултати процене антигенотоксичне активности екстраката и конституената према тестираним мутагенима, при чему је забележен јак потенцијал тестираних једињења да редукују оштећења на молекулу ДНК изазвана деловањем IQ и PhIP мутагена (поделељак „Процена антигенотоксичног ефекта екстраката и конституената *G. lutea* према IQ и PhIP мутагенима променом алкалног комет теста“).

Следећи одељак („Испитивање антигенотоксичног ефекта екстраката *G. lutea* према УВ зрачењу“) представља резултате испитивања УВ-протективног ефекта екстраката линцуре. Као и у претходном одељку, најпре су приказани резултати МТТ теста у циљу одређивања нецитотоксичних доза екстраката на MRC-5 и Hs 294T ћелијама (поделељак „Одређивање



нецитотоксичних концентрација тест супстанци на MRC-5 и Hs 294T ћелијама применом МТТ теста“). Након тога, приказани су резултати испитивања генотоксичног потенцијала екстраката на обе ћелијске линије, које је рађено како би се одредиле негенотоксичне дозе (поделењак „Процена генотоксичног потенцијала екстраката на MRC-5 и Hs 294T ћелијама применом алкалног комет теста“). Надаље, у поделељку „Одабир нелеталних генотоксичних доза УВЦ и УВА зрачења“ одређене су нелеталне генотоксичне дозе зрачења, које су даље коришћене приликом испитивања УВ-протективног ефекта екстраката. Резултати испитивања протективног ефекта екстраката према УВ зрачењу су дати у поделељку „Процена антигенотоксичног ефекта екстраката *G. lutea* према УВЦ и УВА зрачењу“. Они указују на значајну УВ-протективну способност свих тестираних екстраката на обе ћелијске линије и према оба типа УВ зрачења.

Последње потпоглавље „Испитивање антиоксидативног потенцијала екстраката *G. lutea*“ приказује резултате неколико различитих аспеката антиоксидативног деловања екстраката и конституената, испитаних у циљу разумевања могућих механизма остварене антигенотоксичности. Најпре су приказани резултати DPPH теста у одељку „Способност неутрализације DPPH радикала“, на основу којих се може закључити да су надземни делови како плантажних, тако и *in vitro* гајених биљака били успешнији у неутрализацији DPPH слободних радикала, док су међу конституентима најзапаженији ефекат остварили мангиферин и хомоорентин. У следећем одељку („Способност инхибиције липидне пероксидације“) описана је способност екстраката да инхибирају процес липидне пероксидације. Добијени резултати су показали да екстракти поседују слабу до умерену способност да инхибирају липидну пероксидацију, при чему је најјачи ефекат забележен за метанолне екстракте надземних делова биљака. Резултати испитивања способности хелирања јона гвожђа екстрактима *G. lutea* (одељак „Одређивање способности екстраката да хелирају јоне гвожђа“) су показали да се, и у овом тесту, екстракти надземних делова линцуре карактеришу јачом активношћу. У следећим одељцима („Одређивање способности редукције јона гвожђа – FRAP тест“ и „Одређивање способности редукције јона бакра – CUPRAC тест“) су представљени резултати FRAP и CUPRAC тестова, на основу којих се може приметити добар потенцијал, нарочито екстраката листа/изданка да редукују јоне гвожђа и бакра. Наредни одељак “Утицај екстраката и конституената *G. lutea* на експресију *Nrf2* гена у HepG2 ћелијама“ приказује резултате утицаја одабраних екстраката и конституената на експресију *Nrf2* транскрипционог фактора, одговорног за модулацију активности антиоксидативних ензима. Добијени резултати су показали да све тестиране супстанце, а посебно генциопикрозид, повећавају експресију *Nrf2* гена. У последњем одељку резултата „Утицај екстраката и конституената *G. lutea* на садржај и однос редукованог и

оксидованог глутатиона (GSH/GSSG) у HepG2 ћелијама“ показано је да одабрани екстракти и конституенти поседују потенцијал да обнове садржај редукованог глутатиона у ћелији, који је претходно оксидован деловањем IQ и PhIP мутагена.

Поглавље **Дискусија** чини једну целину у којој аутор детаљно анализира и објашњава добијене резултате, поредећи их са досадашњим доступним литературним подацима из исте области истраживања. На почетку поглавља објашњена је потреба за извођењем датог истраживања. Истакнути су проблеми контаминације хране микроорганизмима, као и изложености човека мутагенима из хране и УВ зрачењу, а наведене су и потенцијалне стратегије за решавање истих. Детаљно је објашњена потреба за испитивањем екстраката *G. lutea*, са освртом на значај истраживања биолошке активности *in vitro* екстраката. Даље је дискутован хемијски састав екстраката, уз истицање утицаја коришћеног растварача приликом екстракције. Објашњени су и могући разлози добијеног хемијског профила екстракта *in vitro* изданка, који се карактерише вишеструко већим процентуалним учешћем појединих конституентата (иридоида и секоиридоида), и резултати су поређени са претходно објављеним студијама.

С обзиром на све учесталију резистенцију микроорганизама који контаминирају храну, штетних последица вештачких конзерванаса, као и проблема формирања биофилма у прехранбеној индустрији, надаље је детаљно дискутован добијен антибактеријски ефекат екстраката и конституената линцуре, при чему су истакнуте сличности и разлике са постојећим подацима о антимикробној активности линцуре. Дискутован је и могућ допринос појединих конституената/група конституената остваривању антибактеријског ефекта, те је уочена активност потенцијално приписана садржају полифенола, појединачних конституената, као и синергизму између њих.

У следећој тематској целини анализирани су и објашњени резултати испитивања антигенотоксичног потенцијала екстраката и конституената према мутагенима из хране IQ и PhIP, на бактеријском и *in vitro* сисарском модел систему. Истакнут је јак потенцијал тест супстанци да редукују оштећења на молекулу ДНК изазвана деловањем ових мутагена на HepG2 ћелијама, при чему је оваква активност екстраката линцуре први пут детектована у овој дисертацији. Додатно, добијена дуална генотоксична/анигенотоксична активност екстраката је у даљој дискусији објашњена феноменом хормезиса. Резултати су детаљније анализирани поређењем са доступном литературом и добијени генопротективни ефекат је додатно објашњен присуством полифенола и одређених конституената у екстрактима. Затим су дискутовани резултати УВ-протективног ефекта екстраката линцуре на MRC-5 и Hs 294T ћелијама. Остварени јак потенцијал екстраката да редукују оштећења на молекулу ДНК, изазвана

деловањем УВА и УВЦ зрачења је посебно анализиран и истакнут је значај добијених резултата, с обзиром на чињеницу да је ово прво истраживање УВ-протективног ефекта *G. lutea*.

Како би се објаснили могући механизми остварене антигенотоксичности екстраката и конституената према мутагенима из хране, у следећој тематској целини су дискутовани резултати антиоксидативних тестова. Најпре су анализирани резултати DPPH, TBA, FRAP, CUPRAC и тест хелирања јона гвожђа, при чему је већа активност екстраката надземних делова биљке објашњена и већим приносом полифенола и флавоноида у њима. Резултати су додатно дискутовани поређењем са доступном литературом. Даље, дискутован је и утицај одабраних екстраката и конституената на експресију Nrf2 транскрипционог фактора у HepG2 ћелијама, одговорног за модулацију бројних цитопротективних ензима. Додатно, анализиран је и ефекат екстраката/супстанци *G. lutea* на садржај редукованог и оксидиваног глутатиона, односно њихов утицај на способност регенерације редуковане форме глутатиона у HepG2 ћелијама изложеним мутагенима IQ и PhIP. Добијени резултати дискутовани су у контексту доступне литературе која објашњава могуће механизме утицаја биљних супстанци на експресију Nrf2 фактора и садржај/облик глутатиона у ћелијама. На крају, позивањем на доступну литературу, УВ-протективни ефекат је такође повезан и дискутован у контексту антиоксидативне активности екстраката, а дата су и могућа објашњења потенцијалних механизма којим је остварена јака активност екстраката да редукују УВ-индукована оштећења.

У поглављу **Закључци** изнето је 14 концизних закључака проистеклих из резултата истраживања ове докторске дисертације. Као крајњи закључак истакнут је потенцијал екстраката *G. lutea* да буду коришћени као сировине за формулацију природних дијететских суплемената и УВ-протективних агенаса, те је стога њихово даље истраживање препоручено. Такође је и указано да *in vitro* гајење *G. lutea* представља одличан начин за добијање фармаколошки битних једињења.

У поглављу **Литература** наведено је 277 библиографских јединица. Сви цитирани литературни извори су актуелни и од значаја за тематику докторске дисертације. Они су омогућили лакше разумевање добијених резултата и адекватно су означени у самом тексту дисертације.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Cvetković, S.**, Todorović, S., Nastasijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Đukanović, S., Knežević-Vukčević, J., Nikolić, B., 2020. Assessment of genoprotective effects of *Gentiana lutea* extracts prepared from plants grown in field and *in vitro*. *Industrial Crops and Products*, 154, 112690. **M21a** (IF: 4.244)  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112690>
2. **Cvetković, S.**, Nastasijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Đukanović, S., Tenji, D., Knežević-Vukčević, J., Nikolić, B., 2020. New insight into antigenotoxic activity of *Gentiana lutea* extracts – Protective effect against food borne mutagens. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 858-860, 503251. **M22** (IF: 2.506)  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503251>

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

1. **Cvetković, S.**, Nastasijević, B., Đukanović, S., Mitić-Ćulafić, D., Knežević-Vukčević, J., Marković, T., Radanović, D., Nikolić B., 2018. Antibacterial and cytotoxic potential of *Gentiana lutea* root and leaf extracts. 6<sup>th</sup> Workshop of Specific Methods for Food Safety and Quality, Belgrade, Serbia, Proceedings, ISBN 978-86-7306-148-1, 171, PC7.
2. **Cvetkovic, S.**, Djukanovic, S., Mitic-Culafic, D., Nastasijevic, B., Knezevic-Vukcevic, J., Nikolic, B., 2019. Protective effect of *Gentiana lutea* root and leaf extracts against heterocyclic aromatic amines IQ and PhIP produced in thermally processed meat. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 333, No. 1, p. 012052). IOP Publishing. ISSN: 1755-1307. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/333/1/012052>

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

1. **Cvetković, S.**, Đukanović, S., Nastasijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Knežević-Vukčević, J., Nikolić, B., 2019. Protective effect of *Gentiana lutea* extracts against UV-induced genotoxicity. 6<sup>th</sup> Congress of the Serbian genetic society, Vrnjačka Banja, e-Abstracts Book, ISBN 978-86-87109-15-5, 118, 03-05.
2. **Cvetković, S.**, Tenji, D., Mitić-Ćulafić, D., Đukanović, S., Nikolić, B., 2021. Genoprotective effect of biologically active plant compounds gentiopicroside and mangiferin against foodborne mutagens IQ and PhIP. 1<sup>st</sup> International Online Conference, Natural products application: Health, Cosmetic and Food, e-Abstracts Book, ISBN 978-972-745-286-6, 241, PCF-72.

### Б4. Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64)

1. **Cvetković, S.**, Nastasijević, B., Đukanović, S., Mitić-Ćulafić, D., Knežević-Vukčević, J., Todorović, S., Nikolić, B., 2018. Antigenotoksični potencijal ekstrakata rizoma i lista *Gentiana lutea*. II kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Knjiga sažetaka, ISBN 978-86-81413-08-1, p. 139.

## Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Стефана Д. Цветковић, број индекса Б3010/2015, послата је 01.06.2021. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио истог дана. На основу извештаја који је добијен анализом докторске дисертације Стефана Д. Цветковић под насловом „Антимикробни и антигенотоксични ефекат екстраката линцуре (*Gentiana lutea* L.) гајене у плантажним и лабораторијским условима“ коришћењем програма iThenticate, добијен је индекс сличности који износи 22%. 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 Стефана Д. Цветковић, под насловом „Антимикробни и антигенотоксични ефекат екстраката линцуре (*Gentiana lutea* L.) гајене у плантажним и лабораторијским условима“, те се прописани поступак за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Стефана Д. Цветковић представља оригинални научно-истраживачки рад који се бави испитивањем биолошке активности екстраката линцуре гајене на комерцијалним плантажама и у *in vitro* култури, са циљем формулације потенцијалних природних адитива храни и УВ-протективних агенаса. Добијени резултати представљају први извештај о генопротективном ефекту *G. lutea* према IQ и PhIP мутагенима, као и према УВ-зрачењу, а додатно доприносе бољем разумевању антибактеријске активности екстраката линцуре. 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. Цветковић**, под насловом „**Антимикробни и антигенотоксични ефекат екстракта линцуре (*Gentiana lutea* L.) гајене у плантажним и лабораторијским условима**“, и омогући кандидату јавну одбрану рада.

У Београду, 18.06.2021. године

## КОМИСИЈА

---

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

---

др Бранислав Настасијевић, научни сарадник,  
Универзитет у Београду –  
Институт за нуклеарне науке „ВИНЧА“,  
Институт од националног значаја за Републику Србију

---

др Слађана Тодоровић, научни саветник,  
Универзитет у Београду –  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,  
Институт од националног значаја за Републику Србију

---

др Бранка Вуковић-Гачић, редовни професор,  
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

---

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