

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

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Весне В. Лазић, мастер биолога

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број: 32/30-5.2. од 25.09.2024. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: „Утицај начина екстракције на антиадхезивни и антибиофилмски потенцијал и биолошка својства гљиве *Inonotus obliquus*“, кандидата Весне Лазић, мастер биолога.

Комисија у саставу др Маја Козарски, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Јована Вундук, виши научни сарадник Института за општу и физичку хемију у Београду, др Милка Малешевић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Сенка Видовић, редовни професор Технолошког факултета Универзитета у Новом Саду и др Илија Ђекић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, на основу прегледа, анализе и оцене докторске дисертације подноси Наставно-научном већу Пољопривредног факултета следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ И ДИСЕРТАЦИЈИ

Весна В. Лазић, рођена је 15.11.1993. године у Бајиној Башти, где је 2012. године завршила гимназију "Јосиф Панчић". Исте године уписала је Биолошки факултет Универзитета у Београду на студијском програму Биологија. Основне студије завршила је 2016. године са просечном оценом 8,93. Мастер академске студије уписала је исте године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, на модулу Биологија микроорганизама. Успешно је одбранила мастер рад септембра 2017. године чиме је стекла звање Мастер биолог, са просечном оценом 9,83. У октобру 2017. године уписује Докторске академске студије на Пољопривредном факултету, модул Прехрамбена технологија, смер Технолошка микробиологија.

Током основних и мастер студија била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Од јуна 2018. године је преко позива за талентоване младе истраживаче укључена у научно-истраживачки рад и запослена као истраживач сарадник на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду (истраживач-приправник 2018-2021, истраживач-сарадник 2021-данас). Од 2018. године, ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја ИИИ46010, под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских

технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, а од 2022. године ангажована је на пројекту под називом „Composite clays as advanced materials in animal nutrition and biomedicine - AniNutBiomedCLAYs“ у оквиру пројектног циклуса ИДЕЈЕ Фонда за Науку Републике Србије. Од јануара 2024. године ангажована је на још једном пројекту по називом „Activated Charcoal as a Carrier of Probiotics: A New Approach for Pathogen Elimination in Wounds - ProHealingAC“ у оквиру пројектног циклуса ПРОМИС Фонда за Науку Републике Србије. Као аутор и коаутор објавила је шест научних радова, од којих су два настала из истраживања у оквиру докторске дисертације, на којима је први аутор. На научним скуповима у земљи и иностранству учествовала је са 25 саопштења. Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број 32/9-4.6. од 26.06.2019. године, именована је комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације Весне Лазић под насловом: „Утицај начина екстракције на антиадхезивни и антибиофилмски потенцијал и биолошка својства гљиве *Inonotus obliquus*“. Тема докторске дисертације је успешно одбрањена дана 01.07.2019. године а за ментора је одређена др Анита Клаус, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду. Тема дисертације је пријављена на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду и одобрена од стране Већа научних области биотехничких наука одлуком број 61206-4490/2-19 од 12.11.2019. године.

Докторска дисертација кандидата Весне Лазић, мастер биолога, под насловом „Утицај начина екстракције на антиадхезивни и антибиофилмски потенцијал и биолошка својства гљиве *Inonotus obliquus*“ написана је у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду, као и у складу са пријавом теме која је одобрена од стране Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и Већа научних области биотехничких наука Универзитета у Београду. Докторска дисертација садржи нумерисане делове: насловне странице на српском и енглеском језику, страницу где су наведени ментори и чланови Комисије, страницу са изјавама захвалности, резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, где је наведен УДК број, затим садржај, листу скраћеница и листе табела и слика које су наведене у раду. Дисертација је написана на укупно 139 странице текста (са нумерацијом), поглавља Преглед литературе, Материјал и методе као и Резултати и дискусија подељени су на више потпоглавља и садрже 15 табела и 36 слика. Цитирано је 328 литературних извора. Нумерисани део дисертације садржи следећа поглавља: Увод (стр. 1), Преглед литературе (стр. 2-18), Циљеви истраживања (стр. 19), Материјал и методе (стр. 20-39), Резултати и дискусија (стр. 40-93), Закључци (стр. 94-95), Литература (стр. 96-118), Прилози (стр. 119-134), Биографија аутора (стр. 135), Изјава о ауторству (стр. 136), Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (стр. 137) и Изјава о коришћењу (стр. 138).

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет истраживања ове докторске дисертације је испитивање могућности употребе различитих зелених техника екстракције, као и праћење антимикуробне, антиоксидативне и антитуморске потентности добијених екстраката традиционално познате лековите гљиве *Inonotus obliquus* (Чага). Како су биофилмови у основи антимикуробне резистенције и један од водећих проблема у свету, посебна пажња је усмерена на процену антиадхезивног и антибиофилмског потенцијала екстраката наведене гљиве.

3. ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ ОД КОЈИХ СЕ ПОЛАЗИЛО У ИСТРАЖИВАЊУ

Основне хипотезе од којих се полазило у оквиру ове докторске дисертације су следеће:

- Претпоставка је да у зависности од примењеног начина екстракције постоји разлика у приносима добијених екстраката *I. obliquus*.
- Претпоставка је да се екстракти разликују по способности адхезије, формирања биофилма и разарања одабраних АТСС (American Type Culture Collection) и клиничких сојева патогених бактерија.
- Претпоставка је да постоје разлике појединачних екстраката гљиве *I. obliquus*, као и комбинација различитих концентрација, на способност адхезије, формирања биофилма и разарање биофилмова одабраних АТСС и клиничких сојева патогених бактерија.
- Претпоставка је да постоји разлика у антимикуробној и антиоксидативној способности екстраката *I. obliquus*.
- Претпоставка је да екстракти *I. obliquus* утичу на способност продукције екстраћелијске полимерне супстанце (ЕПС) одабраних АТСС и клиничких сојеви патогених бактерија.
- Претпоставка је да постоје разлике у цитотоксичној и генотоксичној способности екстраката *I. obliquus*.

4. КРАТАК ОПИС САДРЖАЈА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У овом поглављу указано је на значај лековитих гљива, али и дијететских суплемената и функционалне хране на бази гљива. Такође, кандидат истиче и све већу примену природних производа због бројних здравствених предности и са мало или нимало нежељених ефеката. Посебна пажња је усмерена и на добијање биоактивних једињења савременим техникама екстракције, мању потрошњу енергије и смањену употребу штетних растварача. Наведене су неке од предности зелених технологија које би довеле до смањења глобалне емисије укупних гасова стаклене баште, попут употребе "зелених" растварача.

Преглед литературе. Кандидат је у овом поглављу, које се састоји од шест потпоглавља, приказао доступне литературне податке повезане са предметом проучавања докторске дисертације. У првом потпоглављу под називом *Зелене екстракције* приказано је поређење конвенционалних и савремених техника екстракције. Истакнуте су предности савремених екстракционих техника и њихов утицај на хемијски састав и биолошка својства екстраката. Ово потпоглавље обухвата четири поднаслова: *Микроталасна екстракција*, *Ултразвучна екстракција*, *Екстракција субкритичном водом* и *Екстракција суперкритичним угљендиоксидом*. У оквиру сваког поднаслова описане су предности и ограничења сваке од екстракционих техника. Акцент је посебно стављен на нутритивно вредна једињења лековитих гљива и биљака која се могу изоловати применом различитих савремених техника екстракције. У другом потпоглављу *Чага (Inonotus obliquus)* описане су морфолошке карактеристике паразитске гљиве *I. obliquus*, најчешћи домаћини на којима расте, као и њена глобална географска распрострањеност. У трећем потпоглављу *Биоактивна једињења I. obliquus* описан је хемијски састав гљиве. Ово потпоглавље подељено је на три поднаслова, *Полисахариди*, *Полифенолна једињења* и *Терпени*. У сваком поднаслову описана су најзаступљенија једињења у Чаги из класе полисахарида, полифенола и терпена, а посебно инотодиол и бетулинска киселина. Наведена су бројна лековита својства односно како се одражавају на здравље људи. У четвртном потпоглављу *Примена I. obliquus у традиционалној медицини* описана је употреба Чаге која се у многим земљама традиционално користила за превенцију и лечење различитих болести. У следећем потпоглављу *Савремена истраживања – биолошка активност I. obliquus* обухвата три поднаслова. Први поднаслов *Антиоксидативна активност* обухвата преглед радова везаних за антиоксидативну активност гљиве *I. obliquus* и садржај фенолних једињења која испољавају снажан антиоксидативни потенцијал. У другом поднаслову *Антитуморска активност* кандидат је представио биолошки активна једињења изолована из Чаге и њихову активност према различитим туморским ћелијама. Трећи поднаслов *Антимикробна активност* указује на један од највећих глобалних проблема у 21. веку, антимикробну резистенцију, и на многе независне механизме отпорности бактерија на антибиотике. Такође, истакнуто је да је све већи број микроорганизама отпоран на широк спектар антибиотика и да је неопходно увођење нових антимикробних агенаса. У последњем потпоглављу под називом *Биофилм* кандидат је уопштено дефинисао појам биофилма, фазе његовог формирања, као и екстраћелијски матрикс и компоненте које улазе у његов састав. Посебан акценат је на проблемима у савременој медицини и прехранбеној индустрији а који су последица формирања биофилма. У оквиру поднаслова *Међућелијска комуникација бактерија (Quorum Sensing QS)* представљен је значај и важност *QS* у патогенези *Pseudomonas aeruginosa*, као и проналазак нових малих молекула који инхибирају међућелијску комуникацију бактерија и смањују продукцију фактора вируленције.

Материјал и методе. У оквиру овог поглавља наведени су материјали коришћени за рад, као и методе рада. Ово поглавље садржи четири потпоглавља. Свако

потпоглавље садржи поднаслове. У првом потпоглављу *Гљиве коришћене у експерименталном раду* кандидат је навео порекло материјала, да је псеудосклероцијум *I. obliquus* сакупљен са стабала брезе из шумског подручја Монголије и на планини Власини, Србија. У поднасловима овог поглавља дате су детаљне информације о припреми екстраката и описани су поступци савремених екстракционих техника које су примењене у овом истраживању: ултразвучна, микроталасна, екстракција субкритичном водом и екстракција суперкритичним угљендиоксидом. Друго потпоглавље *Хемијска карактеризација екстраката* обухвата анализу екстраката: укупан садржај протеина, анализу полисахарида (укупан садржај шећера, одређивање укупних, α - и β -глюкана и квалитативну анализу шећера хроматографијом високе перформансе са анјонском изменом и пулсном амперометријском детекцијом-НРАЕС/PAD), анализу фенола (одређивање укупних фенола и фенолни профил помоћу течне хроматографије под ултра високим притиском са масено-масеним детектором-УНPLC-DAD-MS/MS). Треће потпоглавље *Биолошка карактеризација екстраката* обухвата осам поднаслова. Поднаслов *Антиоксидативна активност* садржи четири подељка у којима су детаљно описане спектрофотометријске методе за одређивање антиоксидативне активности применом DPPH теста за одређивање способности неутрализације слободних 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикала, ABTS теста за одређивање способности неутрализације радикал катјона 2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) (ABTS), теста за одређивање редукционе способности и теста за хелирање јона гвожђа. Поднаслов *Антибактеријска активност* обухвата податке о пореклу, гајењу и припреми бактеријских сојева коришћених у раду. Затим је описана метода микродилуционог теста којим је испитан антимикуробни потенцијал тестираних екстракта *I. obliquus* према одабраним сојевима и одређивање кинетике раста одабраних бактерија мерењем оптичке густине, али и метода шаховске табеле којом је процењен комбиновани ефекат одабраних екстраката *I. obliquus* и етанолног екстракта кантариона. Трећи поднаслов под називом *Антиадхезивни и антибиофилмски потенцијал екстраката гљиве I. obliquus* обухватио је методу утврђивања продукције биофилма, методу утврђивања појединачних екстраката као комбинација различитих концентрација на формирање биофилма, ефекат на већ формиран биофилм и методу за квантификацију екстраћелијских полимерних супстанци (ЕПС). У наредна два поглавља описане су методе *Флуоресцентне микроскопије* и *Скенирајуће електронске микроскопије* (SEM). У шестом поднаслову *Молекуларне анализе* кандидат описује методе изолације и пречишћавања РНК, реверзну транскрипцију РНК и методу реверзне транскрипције квантитативно-полимеразне ланчане реакције у реалном времену (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction - RT-qPCR), као и праћење ефекта одабраних екстраката *I. obliquus* на експресију одабраних гена. Седми поднаслов *Испитивање биолошког потенцијала екстраката гљиве I. obliquus на ћелијским културама* обухвата одељке у којима се описују поступци чувања ћелија на ниским температурама, активације ћелија, гајење и трипсинизацију, процену броја и вијабилности ћелијских линија, као и одређивање цитотоксичности тестираних екстраката применом теста митохондријске активности (МТТ теста). У последњем поднаслову *Испитивање генотоксичности екстраката гљиве I. obliquus алкалним*

комет тестом дат је детаљан протокол за процену генотоксичног потенцијала одабраних екстраката. Четврто потпоглавље *Статистичка анализа података* укључује описане методе за статистичку анализу добијених резултата.

Резултати и дискусија. Резултати истраживања приказани су јасно и прегледно кроз табеле, слике, графиконе, као и текстуалну анализу, уз јасну дискусију и адекватно поређење са резултатима сличних истраживања доступних у литератури. Ово поглавље се састоји од три потпоглавља при чему свако од потпоглавља садржи више подналова. У првом потпоглављу, *Принос екстраката I. obliquus остварен зеленим екстракцијама* кандидат је описао резултате приноса различито добијених екстраката. Највећи принос добијен је субкритичном воденом екстракцијом у поређењу са свим осталим техникама екстракције за Чаге са оба испитивана подручја. Резултати указују да је принос екстраката директно зависио од примењене технике екстракције. У другом потпоглављу под називом *Хемијска карактеризација екстраката гљиве I. obliquus*, резултати су приказани у оквиру осам подналова. У првом поднаслову који се односи на садржај протеина описано је да су екстракти добијени употребом воде или 50% етанолом, као и екстракти добијени субкритичном воденом екстракцијом показали висок садржај укупних протеина. У следећем поднаслову кандидат је на основу добијених резултата указао да је укупан садржај шећера показао највећи степен варирања у зависности од начина добијања екстраката. Највећи принос шећера утврђен је код субкритичних водених екстраката и значајно је растао са порастом температуре са 120 на 200 °C, код Чаге пореклом из Србије и код Чаге пореклом из Монголије. Екстракција суперкритичним угљендиоксидом дала је најнижи садржај укупних шећера. Поднаслов који се односи на садржај укупних, α - и β -гљукана указује да је на садржај укупних гљукана у екстрактима поред начина екстракције, значајан утицај имао и избор растварача. Показано је да 50% етанол повећава концентрацију укупних гљукана у односу на 96% етанол. Екстракти добијени субкритичном воденом екстракцијом (200 °C) имали су и до 20 пута виши садржај β -гљукана у односу на остале технике екстракције. Затим следи поднаслов у коме су приказани резултати садржаја укупних фенола у екстрактима, при чему је највиши принос ових једињења забележен у екстрактима добијеним комбиновањем 50% етанола и микроталаса. Од раније је познато да додавање воде органским растварачима побољшава релативни поларитет растварача и доприноси бољој интеракцији површине растварача и већег броја фенолних једињења. Такође, истакнуто је да је виши садржај укупних фенола детектован и у узорцима добијеним субкритичном воденом екстракцијом, без обзира на температуру екстракције. У оквиру подналова *Квантитативна и квалитативна анализа шећера у екстрактима гљиве I. obliquus* приказани су резултати квантитативне и квалитативне анализе. Утврђено је присуство 22 различита шећера у свим узорцима, моносахариди су били присутни у знатно вишим концентрацијама у односу на ди- и трисахариде. Глукоза је била најзаступљенији слободни моносахарид у свим екстрактима. Највећа количина овог шећера детектована је у екстрактима добијеним субкритичном воденом екстракцијом. Овом техником екстракције су у значајној количини детектовани и шећери попут туранозе, галактозе, малтотриозе, а такође манитол и сорбитол. У оквиру подналова у коме је описан профил фенолних

једињења кандидат је истакао да је идентификовано 23 различита једињења. Као најзаступљенија фенолна киселина издвојила се хлорогена киселина која је детектована у знатно вишим концентрацијама у односу на било које друго фенолно једињење. Примећено је да су обе Чаге имале исти квалитативни профил, али је концентрација сваког појединачног фенолног једињења варијала у зависности од порекла материјала. Генерално су екстракти били богатији протокатехинском, кафеинском, п-кумаринском и циметном киселином, док су ванилинска, сиригинска, синапинска и ферулна киселина биле присутне у умереним количинама без обзира на технику екстракције и порекло материјала. У оквиру поднаслова који се односи на профил масних киселина описан је садржај главних масних киселина детектован у различитим типовима екстраката. Укупно је идентификовано 36 масних киселина при чему су незасићене масне киселине потврђене у знатно вишим концентрацијама у односу на засићене. У свим узорцима су у највишим концентрацијама биле присутне палмитинска, стеаринска и олеинска киселина. У последњем поднаслову овог потпоглавља *Анализа главних компоненти* графички је представљено груписање екстраката на основу приноса и 51-ог анализираних једињења из екстраката добијених различитим екстракцијама. У оквиру трећег потпоглавља *Биолошка карактеризација екстраката*, резултати су објашњени у оквиру осам поднаслова. Први поднаслов, *Антиоксидативна активност* приказује резултате неколико различитих аспеката антиоксидативног деловања, како би се боље разумео антиоксидативни потенцијал различитих екстраката гљиве *I. obliquus*. Прво су приказани резултати DPPH теста на основу којих се може закључити да код свих тестираних екстраката независно од типа екстракције, са порастом концентрације екстраката расте и способност неутрализације DPPH слободних радикала. Такође, примећено је да су екстракти добијени субкритичном воденом екстракцијом и при најнижој тестираној концентрацији показали изузетну способност хватања слободних радикала. Потом су описани резултати ABTS теста и утврђено је да сви екстракти при концентрацији 1 mg/mL неутралишу скоро све радикале, као и то да су скоро сви екстракти показали бољу ефикасност у односу на позитивну контролу аскорбинску киселину. У следећем одељку су представљени резултати способности редукције јона бакра (Cu^{2+}), на основу којих се може приметити да су се редукциона својства екстраката постепено повећавала са порастом концентрације. Резултати испитивања способности хелирања јона гвожђа (Fe^{2+}) различито добијених екстраката *I. obliquus* показали су да су екстракти добијени субкритичном воденом екстракцијом били знатно ефикаснији од екстраката добијених помоћу микроталаса и ултразвука, иако су и они показали добру способност хелирања феро јона. У оквиру следећег поднаслова, приказани су резултати антибактеријске активности екстраката. Најпре су описани резултати добијени микродилуционом методом, који истичу већу осетљивост Грам позитивних бактерија како код АТСС тако и код клиничких изолата, при чему су најосетљивије на деловање екстраката биле *Enterococcus faecalis* и метицилин резистентни *Staphylococcus aureus* (MRSA). Ови резултати су потврђени праћењем кинетике раста у присуству 4 најактивнија екстракта (екстракти добијени субкритичном воденом екстракцијом). Додатно, приказани су и резултати испитивања комбинованог ефекта 2 субкритична водена екстраката *I. obliquus* и етанолног екстракта кантариона за исте бактерије.

Затим су представљени резултати утврђивања продукције биофилма и одабрана су 4 соја која су показала умерену продукцију, 3 клиничка (*Pseudomonas aeruginosa* MMA83, *E. faecalis* i MRSA) и један ATCC сој (*E. faecalis* 29212). Поднаслов који описује антиадхезивни и антибиофилмски потенцијал екстраката *I. obliquus* даје табеларно приказане резултате деловања екстраката на спречавање иницијалне адхезије и формирање биофилма. Резултати овог дела указују да су скоро сви тестирани екстракти при највишој тестираној концентрацији испољили значајан проценат инхибиције адхезије и продукције биофилма, инхибиција је износила до 60%. Деловање нижих тестираних концентрација (2,5, 1,25 и 0,625 mg/mL) углавном није било статистички значајно. У следећем поднаслову представљени су резултати ефекта екстраката на продукцију екстраћелијских полимерних супстанци, где се види да ниједан од тестираних екстраката није успео да у потпуности спречи продукцију ЕПС што је у сагласности са резултатима квантификације биофилма. Поднаслов флуоресцентна и SEM микроскопија даје микрографије са ефектом екстраката на биофилмове, где се уочава утицај тестираних екстраката на формирање и декомпозицију биофилмова и реорганизацију матрикса. У оквиру седмог поднаслова, приказани су резултати деловања одабраних екстраката на експресију гена који су део међућелијске комуникације бактерија *P. aeruginosa* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *pqsH*, *mvfR*) и гена који су одговорни за вируленцију (*lasB*, *algK*, *phzM*, *pvdS*, *rhlC*), и примећено је да ефекти на анализиране гене варирају у односу на начин добијања тестираног екстракта. Последњи поднаслов трећег потпоглавља обухвата резултате испитивања цитотоксичног потенцијала одабраних екстраката *I. obliquus* на ћелије меланома човека Hs 294T, ћелије колоректалног тумора SW 620 и MRC-5 неизмењене ћелијске линије фибробласта плућа. Показана је цитотоксична активност према туморским ћелијским линијама (Hs 294T и SW 620), али и према неизмењеним ћелијама MRC-5. Додатно, испитан је генотоксични потенцијал одабраних екстраката, а приказани резултати указују да тестирани екстракти углавном нису испољили генотоксични потенцијал према туморским ћелијским линијама, изузев екстраката који су добијени на температури од 200 °C, при највишим тестираним концентрацијама.

Закључак. На основу добијених резултата истраживања и дискусије правилно су изведени одговарајући закључци. Различите зелене технике екстракције значајно су утицале на принос добијених екстракта, највиши принос дала је субкритична водена екстракција. Највиши садржај укупних протеина добијен је применом микроталасне и ултразвучне екстракције када је коришћена вода или 50% етанол. Док је највиши садржај укупних полисахарида и укупних глукана детектован код субкритичних водених екстраката. Утврђено је да је глукоза доминантан моносахарид у свим екстрактима *I. obliquus*. Издвајању фенолних једињења највише је допринело комбиновање 50% етанола и микроталаса, али и субкритична водена екстракција се показала као ефикасна за издвајање ових једињења. Квантитативном анализом потврђено је да је хлорогена киселина најзаступљенија у односу на било које друго фенолно једињење. Микроталасна и ултразвучна екстракција у комбинацији са етанолом дале су знатно више приносе незасићених масних киселина у поређењу са засићеним. Испитивање антиоксидативног потенцијала екстраката различитим

методама, показано је да Чага има изузетан антиоксидативни потенцијал. Иако су сви екстракти показали високу активност, екстракти добијени субкритичном воденом екстракцијом били су нешто супериорнији, што је у корелацији са високим садржајем фенолних једињења, полисахарида и β -глюкана. Микродилуционом методом показана је знатно већа осетљивост Грам позитивних бактерија, посебно *E. faecalis* ATCC 29219 и MRSA, што је потврђено и праћењем кинетике раста у присуству екстраката. Такође, показано је да комбиновани ефекат екстракта Чаге у комбинацији са еталнолним екстрактом кантариона делује синергистички према *E. faecalis* ATCC 29219. Код четири изолата забележена је умерена продукција биофилма, остали изолати испољили су слабију продукцију биофилма. Значајан проценат редукције иницијалне адхезивности и формирања биофилма уочен је само при вишим тестираним концентрацијама на свим одабраним изолатима, ниже тестиране концентрације слабије су испољиле антиадхезивну и антибиофилмску активност посебно према клиничким изолатима. Ниједан екстракт није показао способност потпуног разарања већ формираног биофилма. Показано је да ниједан од екстраката није у потпуности смањило синтезу ЕПС. Флуоресцентном и SEM микроскопијом потврђено је да одабрани екстракти доводе до делимичне декомпозиције биофилма *P. aeruginosa* MMA83. Исти екстракти показали су значајан ефекат на смањење експресије гена (*las*, *rhl* и *pqs*) *P. aeruginosa* MMA83, као и на смањење експресије гена који регулишу синтезу фактора вируленције. Субкритични водени екстракти показали су значајан цитотоксични ефекат према ћелијским линијама тумора, али и према неизмењеним феталним фибробластима плућа, што није пожељно. Генотоксични ефекат према туморским ћелијским линијама испољили су само екстракти добијени на 200 °C.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено 328 релевантних литературних извора. Референце су цитиране на правилан начин, а извор референци је актуелан и одговара тематици која је проучавана.

Прилози. Као прилог дати су прикази табела садржаја различитих шећера, полифенола и масних киселина екстраката српске и монголске Чаге. Такође, приложене су и микрографије добијене флуоросцентном и SEM микроскопијом.

5. ОСТВАРЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу ове дисертације детаљно је испитана могућност примене зелених техника екстракције за добијање екстраката гљиве која има велики научни и комерцијални потенцијал а о чијим се хемијским и биолошким особинама и даље мало зна. Како су постојећа знања базирана превасходно на фолклору и традиционалним рецептима, искоришћење пројектовано на основу научно утемељених знања од пресудне је важности. Овом дисертацијом је, на основу анализа хемијског састава те са њим повезаних биолошких особина, могуће дати практичне препоруке за индустријске процесе екстраховања. Утврђено је како актуелне зелене екстракције утичу на параметре од квалитативног значаја, попут приноса екстракта, као и појединих

једињења од интереса. Познавањем хемијског састава коришћеног материјала могуће је формулисати и комерцијалне производе са фокусом на одређено биолошко дејство, доказано у *in vitro* условима. У научном смислу, ова дисертација је проширила детаљна знања о хемијском саставу гљиве Чаге, као и томе како различито поднебље на којем расте утиче на исти. Осим тога, утврђено је како екстракти добијени на неколико тестираних начина утичу на патогене микроорганизме од важности за прехранбену индустрију али и медицину, као и способност екстраката да спрече патогене бактерије да формирају биофилм.

6. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ

У сарадњи са другим ауторима кандидат Весну Лазић је написала 2 (два) научна рада која су и повезана са дисертацијом и објављена у часописима из категорије М20 и то један са импакт фактором, из категорије (М21 – врхунски међународни часопис) и један из категорије М24 (национални часопис међународног значаја).

Референце:

1. Lazić, V., Klaus, A., Kozarski, M., Doroški, A., Tosti T., Simić, S., Vunduk, J. (2024). The Effect of Green Extraction Technologies on the Chemical Composition of Medicinal Chaga Mushroom Extracts. *J. Fungi* 2024, 10(3), 225; <https://doi.org/10.3390/jof10030225> (M21)
2. Lazić, V., Doroški, A., Djekić, I., Vunduk, J., Kozarski, M., Klaus, A. Total quality index approach applied to Chaga extracts obtained by green extraction techniques. *APTEFF* 09-54/2024 (M24) - прихваћен за публикавање у штампани.

7. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација под насловом „Утицај начина екстракције на антиадхезивни и антибиофилмски потенцијал и биолошка својства гљиве *Inonotus obliquus*“, коју је поднела Весна В. Лазић, мастер биолог, представља оригинални и самостални научно-истраживачки рад из области Технолошког инжењерства. Комисија сматра да је дисертација урађена у складу са планом и програмом који је предложен приликом пријаве теме. На основу анализе, која се односи на научни и стручни допринос остварених резултата ова докторска дисертација представља заокружену научно-истраживачку целину. Кандидаткиња је у циљу правилног дефинисања циљева, хипотеза, предмета и програма истраживања проучила претходна истраживања. Методе које су примењене у експерименталном делу истраживања су савремене и адекватне. Добијени резултати потврдили су постављене хипотезе и у складу су са циљем истраживања. Резултати су прегледно приказани, правилно анализирани и коментарисани са истим или сличним доступним литературним изворима.

Остварени резултати истраживања у овој дисертацији представљају допринос развоју нових, конкурентних и еколошки прихватљивих процеса у екстракцији биолошки активних једињења из *Inonotus obliquus*, гљиве са лековитим својствима. Представљени резултати у великој мери унапређују информације које су претходно биле доступне у научној литератури и имају велики практични потенцијал. Истраживање може дати смернице за примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији.

Имајући у виду постигнуте резултате истраживања, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Весне В. Лазих, под насловом „**Утицај начина екстракције на антиадхезивни и антибиофилмски потенцијал и биолошка својства гљиве *Inonotus obliquus***“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

Београд, 30.09.2024. године

Чланови комисије:

Др Маја Козарски, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Биохемија)

Др Јована Вундук, виши научни сарадник
Институт за општу и физичку хемију, Београд
(ужа научна дисциплина: Биотехнологија)

Др Милка Малешевић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
(ужа научна дисциплина: Молекуларна биологија)

Др Сенка Видовић, редовни професор
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет
(ужа научна област: Фармацеутско инжењерство)

Др Илија Ђекић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Управљање безбедношћу и квалитетом хране)

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Немањина 6, 11080 Београд - Земун
Катедра за технолошку микробиологију

ИЗВЕШТАЈ

О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације под насловом „**Утицај начина екстракције на антиадхезивни и антибиофилмски потенцијал и биолошка својства гљиве *Inonotus obliquus***“, аутора Весне Лазић, констатујемо да је утврђено подударање текста које износи 16%. Овај степен подударности је последица претходно публикованих резултата докторандових истраживања, проистеклих из ове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. Уз то, индексу подударности допринели су и неки општи подаци, као што су латинска имена микроорганизама, скраћенице, опис метода, употреба цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, општих и стручних израза.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Земуну, 06.09.2024. године

Ментор:

др Анита Клаус, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област Технолошка микробиологија)

/ _____ /