

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 06.09.2019. године, прихваћен је извештај ментора др Славише Станковића и др Лидије Шенеровић о урађеној докторској дисертацији Иване М. Алексић, истраживача сарадника, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду под насловом: „**Деривати рамнолипида и 4-аминохинолина као инхибитори вируленције код врста *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens***“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Славиша Станковић, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет, ментор, др Лидија Шенеровић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, ментор и др Дејан Опсеница, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за хемију, технологију и металургију, члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Иване М. Алексић под насловом „Деривати рамнолипида и 4-аминохинолина као инхибитори вируленције код врста *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens*“ представља истраживање које је произашло из вишегодишње потраге за једињењима са анти-вирулентним карактеристикама, која су карактерисана у *in vitro* и *in vivo* условима са испитивањем њиховог потенцијала првенствено на бактеријским врстама *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens*. Ова докторска дисертација је урађена у Лабораторији за молекуларну генетику и екологију микроорганизама, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Изучавање микробиолошког диверзитета и карактеризација корисних срединских микроорганизама“, (ОИ 173048, руководилац др Бранка Васиљевић).

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члану комисије, Сажетак на српском и енглеском језику са кључним речима, Списак скраћеница, Садржај, Текст по поглављима и Списак литературе. Докторска дисертација је написана на 142 стране (проред 1,5), садржи 39 слика и 22 табеле. Дисертација је подељена на осам поглавља: Увод (1-34 страна), Циљ истраживања (35-36 страна), Материјал и методе (37-63 страна), Резултати (64-105 страна), Дискусија (106-117 страна), Закључци (118-121 страна) и Литература (122-142 страна). Поред наведеног теза садржи и Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи четири потпоглавља. Увод садржи значајне литературне податке који су непосредно повезани са темом докторске дисертације. У потпоглављу „Опште карактеристике врста *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens*“ су описане најзначајније карактеристике врста *P. aeruginosa* и *S. marcescens* као што је њихова тексономска припадности, подела по Граму, природна распрострањеност, патогенеза, фенотипске карактеристике и кратак историјат.

У потпоглављу „Процес успостављања инфекција бактеријама *P. aeruginosa* и *S. marcescens*“ дат је опис процеса патогенезе *P. aeruginosa* и *S. marcescens* са акцентом на распрострањености инфекција изазваних овим врстама у болничком окружењу. Описане су три фазе процеса патогенезе код *P. aeruginosa*, затим значај ћелијских структура одговорних за појаву кретања бактерије, улога међубактеријске комуникације и процес ширења инфекција. Код патогенезе *S. marcescens* наведено је која обољења изазива ова врста код људи и побројани фактори вируленције који доприносе патогенези.

У потпоглављу „Фактори вируленције врста *P. aeruginosa* и *S. marcescens*“ детаљно је описана појава међубактеријске комуникације, наведени су фактори вируленције који су под контролом овог процеса, указано је на разлику овог процеса код Грам позитивних и Грам негативних бактерија и описан је кратак историјат открића овог процеса. Међубактеријска комуникација врсте *P. aeruginosa* описана је као комплексна мрежа сигналних путева, састављена из четири међусобно повезана система и описана је хемијска природа аутоиндуцера сваког од система (лактони, хинолини и карбалдехиди). Код међубактеријске комуникације врсте *S. marcescens* указано је на значајну разлику овог и система *P. aeruginosa*, пре свега постојање једног сигналног пута са аутоиндуцерима лактонске природе. Као фактор вируленције ових врста наведена је и покретљивост, и то три типа покретљивости *P.*

aeruginosa (разлика на основу структура за кретање који учествују у успостављању одређеног покрета) и два типа покретљивости *S. marcescens* које зависи од конзистенције подлоге на којој ова врста живи. Следећи описан фактор вируленције је поседовање липополисахарида на спољашњој мембрани ћелије који имају заштитну улогу приликом имунолошког одговора домаћина, као и синтеза пигмената који утичу на ћелијску респирацију, код *P. aeruginosa* описан је пиоцијанин, а код *S. marcescens* продигиозин. У делу овог потпоглавља извојени су екстрацелуларни фактори вируленције ових врста, и то за *P. aeruginosa* посебно описани: алгинат, егзотоксин А, фосфолипаза Ц, протеаза, рамнолипиди и сектеротни систем типа III, док је за *S. marcescens* дат опис протеаза и нуклеаза и појашњена је хемолитичка и цитолитичка активност. Детаљно је описан феномен формирања биофилмова, једног од најзначајнијег вирулентног фактора обе бактеријске врсте. Процес формирања биофилмова подељен је у три фазе. За сваку од фаза (адхезија, матурација и дисперзија) дат је акценат на механизме укључене у настанак ових фаза као и разлике у процесу формирања биофилмова између *P. aeruginosa* и *S. marcescens*. Приликом описа биофилмова *P. aeruginosa* указано је на састав, структуру и значај матрикса биофилма као и осврт на генску регулацију овог процеса и значај међубактеријске комуникације на процес формирања биофилмова. Биофилмови *S. marcescens* су описани као честа појава на медицинским катетерима, и објашњена је улога међубактеријске комуникације на њихово формирање.

У потпоглављу „Лечење бактеријских инфекција – проблем резистенције на антибиотике“ дат је кратак историјат о проналаску антибиотика и указано је на проблем развоја и ширења резистенције. Фактори који доводе до резистенције су бројни, а форма биофилма у којој се велики број патогена налази током хроничних инфекција је отпорнији на дејство антибиотика за разлику од планктноског начина живота. У овом поглављу истакнута је потреба за проналаском терапеутика који могу растурирати формиран биофилм и/или утицати на формирање биофилмова без појаве резистенције. Као алтернатива традиционалном приступу лечења антибиотикима предлаже се анти-вирулентна терапија терапеутицима који не делују на виталне функције микроорганизама него показују инхибиторно дејство на производњу вирулентних фактора. Модулацијом сигналних путева међубактеријске комуникације путем инхибиције синтезе аутоиндуцера, инактивирањем аутоиндуцера или конкуренцијом приликом везивања за рецептор могуће је утицати на синтезу вирулентних фактора без појаве резистенције изазване селективним притиском. У склопу овог поглавља дат је преглед литературе, информације о досад откривеним једињењима са анти-вирулентним карактеристикама природног порекла као и хемијски синтетисаних деривата. Једињења природног порекла углавном су откривена испитивањем активности биљних екстраката или секундарних метаболита непатогених бактерија. Хемијски синтетисана једињења, углавном

синтетисана по угледу на већ постојећа једињења са потврђеним антимикуробним активностима, модификују се у циљу повећања активности и смањења токсичности. Поред поменутих антимикуробијалних пептида и липопетида, указано је на значај аналога аутоиндуцера сигналних путева *P. aeruginosa*. Посебна пажња посвећена је хинолинима (таутомерним формама хинолона), једињењима са широким спектром биоактивности. Хинолони, као аутоиндуцери PQS сигналног пута *P. aeruginosa*, представљају хемијску структуру погодну за развој потентних анти-вирулентних једињења, увођењем малих структурних промена.

У поглављу **Циљ истраживања** као главни циљ дефинисана је идентификација једињења са анти-вирулентним карактеристикама на патогеним сојевима *P. aeruginosa* PAO1 и *S. marcescens*.

Као специфични циљеви наведени су:

1. Потрага за малим молекулима природног порекла са анти-вирулентним дејством, претраживањем колекције срединских микроорганизама Лабораторије за молекуларну генетику и екологију микроорганизама, ИМГГИ УБ, гајењем бактерија у различитим хранљивим подлогама и екстракцијом секундарних метаболита етил-ацетатом,
2. Идентификација активног једињења из укупног бактеријског екстракта хемијским методама,
3. Одређивање структурних захтева неопходних за успостављање инхибиције вирулентности, тестирањем биолошких активности библиотеке хемијски синтетисаних 4-аминохинолина, аналога природних аутоиндуцера PQS система међубактеријске комуникације *P. aeruginosa*,
4. Испитивање активности једињења серијом *in vitro* есеја, тј. утврђивање утицаја на значајне вирулентне факторе оба патогена соја (формирање и растурање биофилмова, синтеза пигмента, кретање),
5. Испитивање утицаја деривата 4-аминохинолина на сигналне путеве међубактеријске комуникације *P. aeruginosa*,
6. Одређивање механизма деловања и оптимизација анти-вирулентних активности одабраних молекула даљом дериватизацијом,
7. Утврђивање ефекта структурних промена тестираног молекула на биоактивност модел организма,
8. Испитивање цитотоксичности једињења на *in vivo* модел организмима *Danio rerio* и *Caenorhabditis elegans*,
9. Испитивање квантитативног односа структуре и активности деривата 4-аминохинолина и моделовање формирања биофилмова *S. marcescens*,

10. Предвиђање оријентације везивања одабраних деривата 4-аминохинолина за рецептор PQS сигналног пута (PqsR рецептор).

У поглављу **Материјал и методе** описане су методе коришћене у реализацији наведених циљева. У првом потпоглављу наведени су бактеријски сојеви и микробиолошке подлоге коришћене за њихово гајење. У потрази за малим молекулима природног порекла претражена је Лабораторијска колекција микроорганизама, и у наредним потпоглављима је описана изолација и култивација бактерија изолованих из ризосфере биљака. У потпоглављу „Екстраховање секундарних метаболита бактерија и њихова хемијска карактеризација” описана је припрема укупних екстраката из бактеријске културе и хроматографске методе раздвајања укупног екстракта у фракције, масена спектрометрија и нуклеарна магнетна резонанца. У потпоглављу „Синтеза и дериватизација једињења” описан је процес дериватизације једињења, ди-рамнолипида и 4-аминохинолина и то амидна дериватизација ди-рамнолипида увођењем бензена, пиперидина и морфолина, и синтеза 35 деривата хинолина. У наредним потпоглављима су описане методе и есеји коришћени у циљу утврђивања анти-вируленте активности једињења и њихових деривата коришћених у овој тези. Прва описана метода је „Одређивање минималне инхибиторне концентрације“, која претходи свим есејима за утврђивање анти-вирулентних карактеристика. Приликом испитивања анти-биофилм активности једињења, коришћено је више методологија, да би се што приближније утврдио механизам деловања једињења. Анти-биофилм есеји су описани у потпоглављима: „Утицај једињења на формирање биофилмова код *P. aeruginosa* и *S. marcescens*“, уз фазу адхезије и без ње, као и испитивање анти-адхезивног потенцијала једињења и „Утицај једињења на дисперзију већ формираног биофилма“. Следећи испитивани вирулентни фактор био је покретљивост бактерија, и методологија је описана у потпоглављима „Испитивање утицаја једињења на различите врсте покретљивости *P. aeruginosa* PAO1“ унутар ког су описане методе за испитивање утицаја једињења на пливање, ројење и грчење., Методологија тестирања утицаја једињења на производњу пигмената је описана у потпоглављима „Испитивање утицаја једињења на међубактеријску комуникацију сојева *Chromobacterium violaceum* CV026 и *S. marcescens* у тесту са дисковима“, и „Утицај једињења на продукцију пиоцијанина код *P. aeruginosa* PA14“. Даље је приказана метода испитивања утицаја једињења на продукцију еластаза. У склопу потпоглавља „Визуализација биофилмова микроскопијом“ описана је методологија припремања узорка за флуоресцентну и скенирајућу електронску микроскопију. У циљу откривања механизма деловања одабраних активних једињења описано је коришћење биосензорских сојева за анализу ефеката на различите сигналне путеве међубактеријске комуникације *P. aeruginosa* (Испитивање утицаја једињења на сигналне

путеве међубактеријске комуникације). У склопу тог потпоглавља описане су методе квантификације аутоиндуцера сигналних путева, као и компетитивне инхибиције рецептора међубактеријске комуникације. У претпоследњем потпоглављу Материјала и метода, описана је методологија коришћена у циљу утврђивања токсичности једињења (Одређивање токсичности једињења). У оквиру овог потпоглавља описана је методологија рада на MRC5 ћелијској линији фибробласта и на *in vivo* модел организмима *Danio rerio* и *Caenorhabditis elegans*. Молекуларно-биолошке методе рађене су у циљу идентификације соја изолованог из ризосфере биљке, чији је укупни екстракт показао анти-биофилм активност и описане су у истоименом потпоглављу. Унутар овог потпоглавља издвојене су следеће методе „Изолација укупне ДНК“, „Умножавање гена за 16S рРНК“, „Агарозна гел електрофореза“ и „Секвенцирање гена за 16S рРНК“. Поред ових метода у овом потпоглављу је описана и анализа утицаја деривата 4-аминохинолина на експресију гена укључених у међубактеријску комуникацију. У оквиру ове методологије описане су следеће методе: „Изолација укупне РНК“, „Синтеза комплементарне ДНК (цДНК) на основу изоловане РНК“, и „Умножавање цДНК real time PCR методом“. На крају поглавља Материјал и методе, налази се потпоглавље „Статистичка анализа резултата“, коришћена у анализи резултата.

Поглавље **Резултати** подељено је у три целине: 1) једињења природног порекла као анти-вирулентни агенси, 2) деривати 4-аминохинолина као анти-вирулентни агенси и 3) *N*'-супституисани деривати 4-амино-7-хлор хинолина дугог ланца као анти-вирулентни агенси. У првом потпоглављу Резултата (Идентификација једињења природног порекла са способношћу инхибиције формирања биофилмова код патогених бактерија) приказани су резултати претраге Лабораторијске колекције, током које је од 155 тестираних сојева издвојен један сој чији је екстракт показао инхибиторно дејство на процес формирања биофилмова код *P. aeruginosa* PAO1. Овај сој је идентификован као *Lysinibacillus* BV152.1. Након фракционисања етил ацетатног екстракта овог соја гравитационом колоном издвојена је активна фракција Ф3 за коју је показано да садржи смешу рамнолипида, од којих највећи удео чине ди-рамнолипиди са 10 угљеникових атома (Rha-Rha-C10-C10). Амидна дериватизација (увођење бензил, пиперидин и морфолин групе) рађена је на ди-рамнолипидима Ф3 фракције BV152.1 и на комерцијално доступним ди-рамнолипидима пореклом из *P. aeruginosa* sp. Ниједан од тестираних рамнолипида и деривата ди-рамнолипида није показао антибактеријску активност. У потпоглављу „Анти-биофилм активност рамнолипида и деривата ди-рамнолипида“ представљени су резултати добијени у различитим есејима за испитивање анти-биофилм активности на сојевима *P. aeruginosa* PAO1 и *S. marcescens* ATCC27117. У циљу одређивања механизма деловања рамнолипида и њихових деривата праћен је њихов утицај на

процес адхезије бактерија, матурације биофилмова, као и способност једињења да растуре пре-формирани биофилм. Показано је да ди-рамнолипиди изоловани из соја BV152.1, као и комерцијални ди-рамнолипиди у мањој мери утичу на фазу адхезије бактерија, док већи инхибиторни ефекат показују на раст биофилмова *P. aeruginosa* PAO1. У склопу истраживања анти-биофилм ефекта, поред наведених сојева тестиран је и ефекат једињења на биофилмове клиничког изолата *P. aeruginosa* DM50. Ди-рамнолипиди оба извора, показали су дозно зависност инхибиције формирања биофилмова *P. aeruginosa* PAO1. Као најпотентнији инхибитор формирања биофилмова *P. aeruginosa* PAO1 издвојио се дериват са морфолинском групом ди-рамнолипида Ф3 са $BFIC_{50}=12,5 \mu\text{g/ml}$ (концентрација при којој се инхибира формирање 50% биофилмова). Тестирањем активности деривата на клиничком соју *P. aeruginosa* DM50, такође се као најактивнији издвојио дериват са морфолинском групом ди-рамнолипида Ф3, инхибирајући процес формирања биофилмова за 65% када је био примењен у концентрацији од $50 \mu\text{g/ml}$, док су се деривати ди-рамнолипида комерцијалног извора показали као неактивни. Највећи ефекат на формирање биофилмова ди-рамнолипиди Ф3 имали су на соју *S. marcescens* ATCC27117, при чему се као најактивнији опет издвојио дериват са морфолинском групом са 88% инхибиције када је био примењен у концентрацији од $50 \mu\text{g/ml}$. И дериват комерцијалног ди-рамнолипида са морфолинском групом показао је сличну активност, инхибирајући 86% формирање биофилма када је био примењен у истој концентрацији. У склопу испитивања анти-биофилм активности рамнолипида и деривата ди-рамнолипида тестирана је и њихова способност да растуре већ формиран биофилм, што је у медицинском смислу релевантнија карактеристика. Рамнолипиди Ф3 у концентрацији од $10 \mu\text{g/ml}$ растурали су 50% пре-формирани биофилма *P. aeruginosa* PAO1, а рамнолипиди комерцијалног извора тек 20%. Дериватизацијом ди-рамнолипида активност им се повећала, при чему су највећу активност показали деривати са морфолинском групом. Рамнолипиди нису показали активност према биофилмовима клиничког изолата *P. aeruginosa* DM50. Такође мали проценат растурања формираног биофилмова добијен је и приликом тертмана биофилмова *S. marcescens* ATCC27117. Као активни деривати ди-рамнолипида Ф3 издвојили су се деривати са бенzenом и пиперидином, са инхибицијом приближно 60% при концентрацији од $50 \mu\text{g/ml}$. Активност деривата са морфолинском групом, најуспешнијег инхибитора формирања биофилмова на тестираним сојевима, потврђена је и микроскопским методама, тестирањем на медицинским катетерима и микроскопским плочицама. У потпоглављу „Утицај ди-рамнолипида на кретање ројењем *P. aeruginosa* PAO1“ приказано је да применом деривата ди-рамнолипида са морфолинском групом из оба извора долази до стимулације ројења. У потпоглављу „Испитивање цитотоксичности тестираних рамнолипида“

описани су резултати који говоре да смеше и изоловани ди-рамнолипиди нису токсични, а да је увођење амидних група довело до раста цитотоксичности већ на концентрацији од 25 µg/ml.

У другом делу докторске дисертације представљени су резултати испитивања активности деривата 4-аминохинолина. У првом потпоглављу овог дела дисертације „Хемијски синтетисана једињења са инхибиторним дејством на вирулентне карактеристике патогених бактерија“ приказана је прва група деривата хинолина која је садржала 27 једињења међусобно различитих према врсти супституената на позицији С7 и дужини алифатичног ланца на позицији С4. У потпоглављу „Тестирање антибактеријске активности деривата 4-аминохинолина према изабраним бактеријским сојевима“, показана је слаба антибактеријска активност деривата 4-аминохинолина са МИК (минимална инхибиторна концентрација) вредностима у опегу од 185 до 5600 µМ, при чему је уочена обрнута корелација између дужине алифатичног низа и антибактеријске активности. У потпоглављу „Утицај деривата 4-аминохинолина на продукцију бактеријских пигмената продигиозина и виолацеина“ је показано да једињења која су имала атом хлора или CF₃ групу у положају С(7) и аминоклифатични ланац са 12 метилених група у положају С(4) (једињења **5** и **10**) делују специфично на продукцију виолацеина, али не и на продукцију продигиозина. Највеће зоне инхибиције виолацеина и продигиозина дала су једињења са једноставним супституентима у различитим положајима хинолинског прстена. У потпоглављу „Инхибиција формирања биофилмова дериватима 4-аминохинолина“ показано је да једињења **5** и **10** инхибирају формирање биофилмова *S. marcescens*, и то за 52% односно 57% при концентрацији 25 µg/ml. Са друге стране, ова једињења су била нешто слабији инхибитори формирања биофилмова код *P. aeruginosa* PAO1, инхибирајући формирање биофилмова за 40% односно 48% у концентрацији 50 µg/ml. Инхибиција формирања биофилмова овим једињењима потврђена је и микроскопским методама. У потпоглављу „Утицај деривата 4-аминохинолина на продукцију пиоцијанина“ показано је да једињење **10** у концентрацији од 50 µg/ml инхибира производњу пиоцијанина за 90%, што је и најбоља активност показана до сада за једињења хинолинске пророде. У потпоглављу „Утицај деривата 4-аминохинолина на производњу аутоиндуцера сигналних путева међубактеријске комуникације врсте *P. aeruginosa*“ приказани су резултати који се односе на одређивање механизма деловања деривата хинолина. Једињења **5** и **10** показала су највећи утицај на PQS сигнални пут инхибирајући га за 85% односно 75% при концентрацији од 50 µg/ml. Даље је изучаван квантитативни однос структуре и активности и моделовање инхибиције формирања биофилмова код *S. marcescens*, и у истоименом потпоглављу је приказано да величина и гранање молекула значајно доприносе активности једињења, као и то да повећање липофилности једињења доводи до повећања анти-биофилм потенцијала.

Како би се утврдили структурни захтеви за повећање анти-вирулентних активности 4-аминохинолина, оптимизоване су структуре 4-амино-7-хлор хинолина, и синтетисана је нова библиотека *N'*- супституисаних деривата. Као полазно једињење за дериватизацију изабрано је једињење **4** (AQ8) које је показало инхибиторно дејство на формирање биофилмова, али није показало утицај на производњу вирулентног фактора пиоцијанина. Ова библиотека деривата садржала је осам једињења чији је анти-вирулентни потенцијал детаљно испитан. У потпоглављу „Испитивање анти-вирулентног потенцијала *N'*-супституисаних деривата 4-амино-7-хлор-хинолина на *P. aeruginosa* PAO1“ прво је показано одсуство антибактеријске активности код свих деривата. Као најактивнији инхибитор производње пиоцијанина издвојило се једињење **34**, са 88% инхибиције производње пиоцијанина у концентрацији од 50 µg/ml. Ово једињење показало се и као најактивнији инхибитор формирања биофилмова ове групе деривата, са 50% инхибиције при концентрацији од 50 µg/ml. Једињење **34** такође је инхибирало грчење бактерија, али је показало слаб утицај на продукцију еластаза. У склопу испитивања механизма деловања ових деривата у оквиру потпоглавља „Утицај *N'*-супституисаних деривата 4-амино-7-хлор-хинолина на сигналне путеве међубактеријске комуникације врсте *P. aeruginosa* у есеју конкуренције за рецептор“ и „Утицај *N'*-супституисаних деривата 4-амино-7-хлор-хинолина на продукцију аутоиндуцера сигналних путева међубактеријске комуникације врсте *P. aeruginosa*“ приказано је да једињење **34** инхибира активност PqsR рецептора, и смањује производњу аутоиндуцера PQS/HHQ при концентрацији 50 µM. У потпоглављу „Утицај *N'*- супституисаних деривата 4-амино-7-хлор-хинолина на експресију гена укључених у међубактеријску комуникацију“ приказано је да ни један дериват из ове групе нема утицај на експресију гена укључених у сигналне путеве међубактеријске комуникације. У потпоглављу „Предвиђање оријентације везивања једињења **4** (AQ8) и **34** за PqsR рецептор“ приказани су резултати моделовања везивања једињења **34** за PqsR рецептор. Хинолински прстенови једињења **34** и **4** (AQ8) везују се за исти хидрофобни део рецептора као и природни аутоиндуцери, као и да су споредни ланци једињења **34** постављени на супротној страни у поређењу са полазним једињењем **4** (AQ8) због стеричног положаја терминалног *N'*- супституента који је додатно стабилизује везу са рецептором. Резултати испитивања анти-вирулентног потенцијала ове групе деривата на *S. marcescens* приказани су у потпоглављу „Испитивање анти-вирулентног потенцијала *N'*-супституисаних деривата 4-амино-7-хлор-хинолина на *S. marcescens* ATCC27117“. Деривати нису показали антибактеријску активност, нити им се променила способност да инхибирају производњу продигиозина у односу на полазно једињење **4** (AQ8). Од осам тестираних једињења три су показала инхибицију формирања биофилма од 50% при концентрацији од 50 µg/ml, што је слична вредност активности полазног једињења. Испитивања на MRC5 ћелијској линији

фибробласта плућа и на два *in vivo* модел организма, нематоди *Caenorhabditis elegans* и кичмењачког модела зебра рибице *Danio rerio* показала су високу токсичност *N*'-супституисаних деривата 4-амино-7-хлор-хинолина, што представља проблем који је неопходно решити у даљим истраживањима како би се у потпуности искористио анти-вирулентни потенцијал ове групе једињења.

У поглављу **Дискусија** детаљно су анализирани добијени резултати и дат је критички осврт упоређујући их са резултатима других истраживања приказаним у наведеној литератури. Ово поглавље је подељено на два потпоглавља: „Анти-вирулентни агенси природног порекла“ и „Хемијски синтетисана једињења као анти-вирулентни агенси“. Прво потпоглавље посвећено је медицинском и индустријском значају рамнолипида. У досадашњој литератури није приказана стратегија модификације активности рамнолипида путем амидне дерватизације, што указује на иновативност овог истраживања, као и велики потенцијал ових једињења за даље унапређивање. У другом потпоглављу истакнут је значај рационалног хемијског дизајна у процесу развоја нових антимикуробних лекова, односно агенаса са анти-вирулентним активностима који би били алтернатива традиционалној терапији антибиотцима.

У поглављу **Закључци** изнето је 16 концизних закључака проистеклих из релевантних резултата рада ове докторске дисертације, а који су у складу са постављеним циљевима и задацима истраживања.

У поглављу **Литература** дата је листа 292 извора литературе. Сви цитирани литературни извори су актуелни и у складу са последњим научним открићима. Ови литературни подаци су омогућили лакше разумевање добијених резултата и олакшали дискусију. Наведени извори покривају све области обрађене у докторској дисертацији и адекватно су назначени у самом тексту.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Aleksic I**, Petkovic M, Jovanovic M, Milivojevic D, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J, Senerovic L. (2017) Anti-biofilm properties of bacterial Di-Rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Front Microbiol.* 8: 2454, **M21**, (**IF: 4,019**), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02454>
2. **Aleksic I**, Segan S, Andric F, Zlatovic M, Moric I, Opsenica D and Senerovic L. (2017) Long-chained 4-Aminoquinolines as Quorum Sensing Inhibitors in *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chemical Biology.* 12 (5), pp 1425–1434, **M21** (**IF: 4,592**), <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscchembio.6b01149>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Aleksic I.**, Jeremic J., Milivojevic D., Moric I., Vasiljevic B., and Osenica D. (2018) 4-Aminoquinoline derivatives as promising agents against *Pseudomonas aeruginosa* chronic infections. *Bacterial Persistence and Antimicrobial Therapy, EMBO Workshop, Ascona Switzerland*, **M34**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Spasic M., **Aleksic I.**, Senerovic L., Opsenica D. (2018) Synthesis and anti-virulence activity of N⁷-benzyl-4-aminoquinolines against *Serratia marcescens*. Šesta konferencija mladih hemičara Srbije. *Kratki izvodi radova radova*, MH01 OE 1 str 75. ISBN 978-86-7132-072-6 **M64**
2. **Aleksic I.**, Jeremic J., Milivojevic D., Moric I., Opsenica D., Senerovic L. (2018) N-supstituisani 4-aminohinolini dugog niza kao novi quorum sensing inhibitori kod *Serratia marcescens*, 55. savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad. *Kratki izvodi radova radova*, MH P 03, str 81. ISBN 978-86-7132-069-6 **M64**

Провера оригиналности докторске дисертације

Извештај провере оригиналности докторске дисертације Иване М. Алексић, добијен коришћењем програма iThenticate у Универзитетској библиотеци Светозар Марковић у Београду, показао је индекс сличности од 21%. Увидом у Извештај утврђено је да су подударна углавном последица претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из докторандове дисертације, личних имена и библиографских података о коришћеној литератури. Додатно, одређени делови текста код којих је утврђено подударње нису повезани и немају смисао. Извештај провере оригиналности докторске дисертације Иване М. Алексић указује на позитивну оцену, односно на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидата Иване М. Алексић под насловом „Деривати рамнолипида и 4-аминохинолина као инхибитори вируленције код врста *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens*“ представља оригиналан научно-истраживачки рад који се бави испитивањем анти-вирулентних активности природних и хемијски синтетисаних једињења различитих структура. Целокупни резултати овог истраживања допринели су бољем разумевању механизма дејства рамнолипида, 4-аминохинолина и њихових деривата и указали су на значај структурних модификација ових једињења у циљу побољшања њихових анти-вирулентних ефеката. Дисертација се одликује јасно дефинисаним циљевима, адекватним методама и успешно реализованим експериментима. Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску дисертацију, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску дисертацију и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидата Иване М. Алексић и омогући кандидату јавну одбрану рада.

У Београду, 09.09.2019. године

КОМИСИЈА:

др Славиша Станковић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Лидија Шенеровић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду, Институт за молекуларну
генетику и генетичко инжењерство

др Дејан Опсеница, научни саветник,
Универзитет у Београду, Институт за хемију,
технологију и металургију