

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

32/10-6.1.
(Број захтева)

Веће научних области
биотехничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

25.09.2019.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукцију
хуманих норовируса *in vitro*“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Прехрамбена технологија

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1. Ивана, Милан, Живковић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета,
студијски програм):

Универзитет у Београду

Пољопривредни факултет - Студијски програм
Прехрамбена технологија

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2014.

4. Година уписа на докторске студије: 2014/2015.

5. Назив студијског програма
докторских студија: Прехрамбена технологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: Драгослава Радин

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Živković, I., Šavikin, K., Zdunić, G., Tivković, J., Bigović, D., Menković, N., **Radin, D.** (2018): Antiviral activity of medicinal plants extracts against foodborne norovirus. *Lekovite sirovine*, 38: 31-34.
2. **Radin, D.** (2014): New trends in food- and waterborne viral outbreaks. *Archives of Biological Sciences* 66: 1-9.
3. **Radin, D.** (2012): Human norovirus transmission due to contaminated fresh fruit and vegetables. *Archives of Biological Sciences* 64: 1405–1412.
4. **Radin, D.**, D'Souza, D.H. (2011): Evaluation of two primer sets using newly developed internal amplification controls for rapid human norovirus detection by SYBR Green I based real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology* 3: 61-69.
5. **Radin, D.**, D'Souza, D. H. (2011): Simple and rapid detection of human Norovirus from produce using SYBR Green I-based real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology* 3: 121–129.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 25.09.2019. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/10-6.1.
Датум: 25.09.2019. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 44. Статута Пољопривредног факултета (2018. година), Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 25.09.2019. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени пријаве теме докторске дисертације коју је поднела **ИВАНА ЖИВКОВИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ЕКСТРАКТ КОРЕ НАРА (*Punica granatum* L.) КАО ПРИРОДНИ АНТИВИРУСНИ АГЕНС ЗА РЕДУКЦИЈУ ХУМАНИХ НОРОВИРУСА *in vitro*»**.

II За ментора се именује др Драгослава Радин, редовни професор.

III На одлуку о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора сагласност даје одговарајуће Веће научних области Универзитета у Београду.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

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

Датум: 09.07.2019.

**Предмет: Извештај комисије о оцени пријаве теме докторске дисертације мастер
Иване Живковић**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, бр. 32/9-3.4. од 26. 06. 2019. године, именовани смо у Комисију за оцenu пријаве теме докторске дисертације коју је поднела Ивана Живковић, мастер, под насловом: „**Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукацију хуманих норовируса *in vitro***“. На основу увида у садржај пријаве докторске дисертације, подносимо Научно-наставном већу Пољопривредног факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Наслов дисертације

Кандидат је пријавио докторску дисертацију под називом „**Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукацију хуманих норовируса *in vitro***“. Комисија сматра да је предложени наслов тезе у сагласности са предметом, програмом и научним циљем истраживања.

2. Предмет и програм истраживања

Кандидат је у предмету и програму истраживања ове докторске дисертације предложио: утврђивање могућности редукације хуманих норовируса у суспензији, на површинама које долазе у контакт са храном као и на биолошким површинама свежег воћа и поврћа, екстрактом коре нара који представља природни антивирусни агенс. Хумани норовируси се често и лако преносе храном и другим површинама и представљају патогене који изазивају велики број обољења гастроентеритиса код свих старосних категорија, при чему су деца млађа од 5 година, старије особе и особе са ослабљеним имунитетом најосетљивији. Хумани норовируси имају бројне карактеристике које их сврставају у врло инфективне микроорганизме. Њихова инфективна доза је изузетно ниска, док се у фецесу и повраћајном садржају оболелих налазе у изузетно високом броју, добро преживљавају у веома различитим условима спољашње средине и могу се наћи на бројним површинама које уобичајено долазе у контакт са храном, као што су на пример челик и пластика. Такође, добро се адсорбују за површину свежих производа, као што су на пример чери парадајз и млади лук, задржавајући инфективност и до пет недеља у одговарајућим условима складиштења. Зато је један од важних аспеката програма истраживања могућност коришћења екстракта коре нара у циљу редукације норовируса на овим површинама. Такође, хумани норовируси су отпорни на многе еколошке услове средине, третмане који се уобичајено примењују у прехранбеној технологији као и на

многа средства за дезинфекцију и санитацију која се уобичајено примењују у погонима за прехранбену индустрију, а која показују добар антибактеријски ефекат. Средства која су ефикасна против вируса су на бази хлора, међутим како је установљен лош ефекат примене средстава на бази хлора у преради свежих производа, врло је важна могућност редукције норовируса на површини ових производа неким другим алтернативним природним антивирусним једињењима. Истраживања ће обухватити и испитивање антивирусног деловања екстракта коре нара у моделу хране (млеко и сок) као и у симулираним гастро-интестиналним условима. Значајан допринос ових истраживања заснива се на испитивању наведених природних антивирусних компоненти на редукцију честица хуманих норовирусних, а не њихових сурогата. Деловање одабраних биљних екстраката на редукцију норовируса пратиће се молекуларном методом квантитативна ланчана реакција полимеразе којој предходи реверзна транскрипција (RT-qPCR). Посебно је интересантна могућност коришћења биомасе коре плода нара, која остаје као отпадни продукт после прераде, а може бити искоришћена као потенцијално високо вредан извор антимикробних једињења са фармацеутским значајем или за примену у санитацији.

Хумани норовируси су најчешћи агенси вирусног акутног гастроентеритиса, обољења које се често јавља у виду епидемија широм света. Најчешћи симптоми обољења су дијареја, повраћање, мучнина, болови у стомаку, главобоља и болови у телу. Основни пут преноса норовируса је фекално-орални, контаминираном храном и водом, директним контактом са оболелом особом, контактом са контаминираним површинама, као и преко аеросола (Radin, 2012). Према подацима Европске агенције за безбедност хране норовируси се убрајају међу најзначајније алиментарне патогене (EFSA, 2018). Србија је једна од земаља коју Европски систем брзог упозорења за храну и храну за животиње (The European Union Rapid Alert system for Food and Feed, EU RASFF) често цитира као земљу порекла норовируса и најчешће се те упозоравајуће нотификације односе на контаминацију малине овим вирусима (Papanagiotou, 2017).

Вируси рода *Norovirus*, класификовани у фамилију *Caliciviridae*, су изометријски вируси (27 - 40 nm) без овојнице, са геномом који чини линеарна позитивно оријентисана једноланчана РНК. Геном је ковалентно везан за геном вирусног протеина (viral protein genome -VPg) на 5' крају а на 3' крају налази се поли (A) реп. Геном величине 7.6 kb, је организован у три отворена оквира читања (open reading frame - ORF), означени као ORF-1, ORF-2, и ORF-3, који кодирају осам вирусних протеина. ORF-1 кодира полипротеин који се протеолитички преводи у шест неструктурних протеина, укључујући норовирусну протеазу (Pro) и РНК-зависну-РНК полимеразу (RdRp). ORF-2 и ORF-3 кодирају структурне компоненте вириона, и то ORF-2 протеине капсида (viral protein 1 - VP1), а ORF-3 мање структурне протеине (VP2) који су важни за стабилност VP1. Генетски су веома разноврсни и групушу се у шест геногрупа (GI-GVI) и више од 40 генотипова. Геногрупе GI, GII, GIV обухватају хумане генотипове, као и генотипове специфичне за свиње (GII) и псе (GIV и GVI) (Vinjé, 2015). Доминантан генотип који најчешће изазива епидемије широм света је GII.4 (Burke et al., 2019). Хумани норовируси имају ниску инфективну дозу, 10-100 вирусних честица може изазвати обољење код свих старосних група. Током акутне фазе болести, норовируси се налазе у хуманом фецесу у великом броју, и до 10^5 - 10^{11} геномских копија по граму (Atmar et al., 2008). Честице вируса се излучују преко фецеса и до неколико недеља након престанка симптома болести.

Једна од важних карактеристика хуманих норовируса је перзистентност у различитим условима спољашње средине. Тако на пример, на површинама преживљавају дуже од 56

дана при широким температурним распонима (4°C - 55°C) (Kotwal and Cannon, 2014). Такође, отпорни су на многа дезинфекциона средства, етар, алкохол, итд. Средства на бази хлора су ефикасна за редукцију норовируса, али је препорука да се за површине које долазе у контакт са храном у прехранбеној индустрији користе концентрације 200 ppm слободног хлора. Међутим, иако су дезинфекциона средства на бази хлора/хипохлората ефикасна према већини микроорганизама, резидуи који настају током њихове употребе представљају ризик по здравље људи. То је разлог да је у неким земљама Европске Уније уведена забрана коришћења ових средстава у производњи свежег сеченог воћа и поврћа. Такође, конвенционална хемијска средства за санитацију не спречавају реконтаминацију и могу да доведу до појаве резистентних сојева, што има за последицу да је и до 50% површина контаминирано.

Уочава се потреба за алтернативним ефикасним средствима у циљу контроле контаминације ентеро патогенима и њиховог преношења. Један од могућих извора су природни екстракти биљака који се због својих значајних антимикробних својстава користе од најранијих времена. Екстракти биљака садрже велики број секундарних метаболита, претежно полифенолне компоненте, које представљају значајне антимикробне агенсе, укључујући и њихов антивирусни потенцијал (Li et al., 2012; Kamimoto et al., 2014; Јовановић et al., 2017).

Међу многим истраживаним биљним врстама, значајан је нар (*Punica granatum* L.), чији су сок и кора богат извор полифенола, укључујући флавоноиде и танине. Као најважније биоактивне компоненте нара наводе се пуникалагини и пуникалини. Водени екстракт коре нара показује активност према *Escherichia coli* O157:H7, метанолни екстракт инхибира формирање биофилмова *Staphylococcus aureus*, а пречишћен екстракт инхибира репликацију вируса инфлуенце и HIV-1 (Sundararajan et al., 2010; Howell and D'Souza, 2013).

Како, све до недавно, норовируси нису могли да се култивишу у системима који се заснивају на ћелијској култури, досадашња истраживања и доступни подаци о перзистентности и резистентности норовируса, углавном су заснована на истраживањима њихових сурогата *Feline calicivirus* (FCV) и *Murine norovirus* (MNV). Међутим, новија истраживања указују да, иако су сурогати слични хуманим норовирусима, уочене разлике у погледу веће резистентности и стабилности норовируса у различитим условима средине, доводе у питање погодност коришћења резултата добијених сурогатима (Knight et al., 2016). Детекција норовируса у храни је отежана због комплексног матрикса самог производа, неравномерне распоређености и присутности честица у малом броју. У храни вируси су инертни, генерално присутни у малом броју и хетерогено распоређени у великим узорцима хране. Такође, различите категорије хране најчешће представљају сложени матрикс у коме су присутне бројне компоненте које могу бити значајни инхибитори метода које се користе за идентификацију вируса. С друге стране, обавезан корак је изолација њихове нуклеинске киселине, при чему су протоколи за изолацију РНК доста сложени и дуго трају. За детекцију норовируса у клиничким узорцима, храни и узорцима из спољашње средине, користе се молекуларне методе, а метода real-time RT-PCR (квантитативна ланчана реакција полимеразе којој предходи реверзна транскрипција - RT-qPCR) коришћењем различитих комбинација прајмера, сматра се за „златни стандард“ у дијагностичким лабораторијама (Radin, 2013). Једна група прајмера базира се на идентификацији циљних очуваних региона у оквиру ORF1, и то регион који кодира РНК-зависну-РНК полимеразу. Друга група прајмера базира се на идентификацији

циљних конзервативних региона генома на споју ORF1-ORF2, који одговарају нуклеотидима на позицији 5075 - 5097 за GI и 4922 - 4941 за GII, који међу норовирусима омогућавају амплификацију великог броја инфективних хуманих генотипова. Овај регион као циљни регион за RT-PCR детекцију норовируса, изабрао је и Европски комитет за стандардизацију (CEN/TC275/WG6/TAG4 група) детекције норовируса и хепатитис А вируса у храни и флашираној води,

3. Научни циљ истраживања

Хумани норовируси се убрајају међу најзначајније алиментарне патогене, који добро преживљавају у храни, на површинама које долазе у контакт са храном и отпорни су на многа средства која се користе за дезинфекцију и санитацију у погонима прехранбене индустрије. Средства на бази хлора су ефикасна за редукцију норовируса, међутим, резидуи који настају током њихове употребе представљају ризик по здравље људи. На основу наведеног уочена је потреба да се пронађу нова алтернативна природна антиноровирусна средства и постављени су следећи циљеви истраживања:

- Између 11 потенцијалних кандидата биљних врста, одабрати биљни екстракт и одговарајућу концентрацију која неће инхибирати молекуларну методу детекције, али ће редуковати честице норовируса на статистички значајном нивоу;
- Хемијска карактеризација одабраног биљног екстракта;
- Испитати антивирусни ефекат одабраног екстракта у суспензији норовируса на две температуре инкубације, амбијенталној 25°C и температури човековог тела 37°C;
- Испитати антивирусни ефекат одабраног екстракта у симулираним гастричним и интестиналним условима;
- Испитати да ли биоактивне материје екстракта имају антивирусни ефекат на редукцију честица норовируса у комплексном матриксу изабраног модела хране;
- Тестирати антивирусни ефекат одабраног екстракта на површинама које долазе у контакт са храном (пластика и метал);
- Испитати антивирусни потенцијал одабраног екстракта на биолошким површинама (чери парадајз и млади лук);
- Одредити степен редукције броја честица норовируса деловањем комерцијалног дезинфекционог средства на бази хлора;
- Могућност примене FLASH® методе (алерген индикатор протеин тест) за детекцију честица норовируса на површинама које долазе у контакт са храном;
- Коришћење брзе методе одређивања аденозин трифосфата (АТФ), за предвиђање успешности имплементације хигијенских корективних мера, у циљу смањења преноса хуманих норовируса површинама које долазе у контакт са храном;
- Анализа честица норовируса трансмисионим електронским микроскопом у суспензији и у раствору са екстрактом.

4. Основне хипотезе од којих се полази

На основу прегледа литературе, кандидат наводи и постаља следеће хипотезе:

- Хумани норовируси су перзистентни према различитим еколошким факторима (ниска рН вредности, висока и ниска температура);
- Хумани норовируси се могу наћи на контактним површинама;

- Хумани норовируси доспевају у храну преко контактних површина;
- Храна има протективни ефекат у односу на честице норовируса;
- Одабрани биљни екстракти имају антивирусни ефекат на хумане норовирусе у *in vitro* условима;
- Екстракт коре и природни сок нара су богати биоактивним једињењима;
- Важне биоактивне компоненте нара су пуникалагини и пуникалини;
- Одабрани екстракт може редуковати хумане норовирусе у моделу хране;
- Одабрани екстракт има антивирусни ефекат у симулираним гастро-интестиналним условима;
- Одабрани екстракт има антивирусни ефекат на различитим површинама које долазе у контакт са храном као и на самим биолошким површинама (одабрани производи).

5. Материјал и методе који ће се користити у истраживањима

Материјал:

- Узорци фецеса пацијената са симптомима акутног вирусног гастроентеритиса обезбеђени су у сарадњи са Универзитетском дечијом клиником Тиршова, Београд, (Богићевић et al., 2014).
- Биљни екстракти: *Sideritis raeseri* (планински чај, биљка); *Gentiana asclepiadea* (свећица, биљка); *Aronia melanocarpa* (аронија, корен); *Gentiana lutea* (жута линцура, лист); *Helichrysum plicatum* (смиље, корен); *Hypericum perforatum* (кантарион, биљка); *Aronia melanocarpa* (аронија, плод); *Satureja subspicata* (ртањски чај, биљка); *Mahonia aquifolia* (махонија, биљка); *Punica granatum* (нар, кора); *Vitis vinifera* var. Prokupas, биће припремљени у Институту за проучавање лековитог биља „Др. Јосиф Панчић“ Београд.

Методе:

1. Припрема суспензије са хуманим норовирусима

Од узорака фецеса припремиће се 10% суспензија у стерилном фосфатном пуферу. Идентификација и одређивање броја вирусних честица у суспензији урадиће се применом комерцијалног кита (Quantification of Norovirus genotype 1 and 2, Primer Design™ Ltd, genesig, Велика Британија). Број геномских еквивалената у суспензији биће одређен методом апсолутне квантификације, применом стандардне криве. Позитивна контрола служи да се одреди број геномских еквивалената у суспензији.

2. Изолација РНК норовируса

За изолацију РНК норовируса користиће се кит Ribo-Virus (Sacace, Biotechnologies, Италија). Према потребама истраживања и добијеним резултата, користиће се и директан метод изолације Trizol™ реагенсом (Invitrogen, Италија) (Radin и D'Souza, 2011b).

3. Оптимизација методе третмана норовируса биљним екстрактима у *in vitro* условима

Планирани су експерименти са 11 биљних екстракта на две температуре (1h / 25 °C и 37°C) у различитим концентрацијама (0.2, 0.4, 1 и 2.5 mg/mL). Очекује се да ће активне компоненте биљних екстракта у некој мери утицати на квантитативну ланчану реакцију полимеразе којој предходи реверзна транскрипција (RT-qPCR). Планирана је оптимизација методе изолације како би се добили валидни и поновљиви резултати.

Наведено представља одлучујући моменат приликом избора екстракта са којима ће се вршити даља истраживања.

4. Припрема екстракта коре нара

Дивљи плодови нара сакупљени су у селу До (Босна и Херцеговина). Кора плодова нара суши се на ваздуху, а затим следи мацерација са 70% етанолом и упаравање под ниским притиском на температури $< 50^{\circ}\text{C}$.

Укупан садржај фенола одређује се спектофотометријски, користећи измењен Folin-Ciocalteu метод (Waterman and Mole, 1994) на 765 nm UV/VIS спектофотометром (HP 8453, Agilent Technologies, Сједињене Америчке Државе).

Садржај танинских материја одређује се на основу Европске Фармакопеје 7.0. (European Pharmacopoeia, 2011). Абсорбанца смеше мери се на 760 nm коришћењем UV/VIS спектрофотометра (HP 8453, Agilent Technologies, САД). Укупан садржај изражава се као проценат пирогалола.

HPLC анализа појединих активних компонената вршиће се помоћу инструмента Agilent 1200 RR HPLC (Agilent, Waldbronn, Немачка) који је опремљен ДАД детектором, коришћењем реверзне фазе аналитичке колоне Zorbax SB-C18 (Agilent), (величина честица 5 μm ; 150 mm $\times$ 4.6 mm). Мобилна фаза А је раствор ортофосфорне киселине у води (1% v/v), а мобилна фаза Б је ацетонитрил. Брзина протока износи 1 mL/min, запремина узорка 5 μL . Температура колоне се одржава на 25°C . Детекција компонената се врши на 260 и 320 nm. Резултати се рачунају на основу калибрационих крива стандарда (пуникалагин, пуникалин, гална киселина и елагна киселина).

5. Испитивање утицаја екстракта коре нара у *in vitro* условима

Планирано је испитивање антивирусног ефекта екстракта коре нара у концентрацијама 2 mg/mL и 5 mg/mL у једнаким односима запремина са суспензијом хуманих норовируса. Инкубација узорака радиће се на две температуре (25°C и 37°C).

Изолација норовирусне РНК након третмана са екстрактом. Изолована норовирусна РНК ће се додатно пречистити са OneStepTM Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, САД) како би се уклонили сви трагови који би могли да имају инхибиторни ефекат. Изолована и пречишћена РНК се елуира у РНК елуенту и чува -78°C до даље анализе.

6. Редукција хуманог норовируса екстрактом коре нара на површинама које су у контакту са храном

Обележене стерилне површине (нерђајући челик и пластика, површине величине 5x5 cm) биће третиране суспензијом хуманих норовируса (позитивна контрола); суспензија са хуманим норовирусима и екстрактом коре нара (5 mg/mL) (третман) и раствор фосфатног пуфера (негативна контрола). У стерилним условима површине ће бити остављене 1 h на 25°C , а узорци ће се узимати методом брисева.

7. Редукција хуманог норовируса комерцијалним дезинфекционим средством

Приликом избора комерцијалног дезинфекционог средство водиће се пажња да главни састојак мора бити активна компонента на бази хлора (NaOCl , 4.5% [w/v]) која је ефикасно антивирусно средство. Помешаће се једнаке запремине суспензије хуманих норовируса и дезинфекционог средства, и оставити да делује 1 h.

Метода узимања брисева са контактних површина (пластика и нерђајући челик) у склопу брзе LIGHTNING ATP методе која се заснива на детекцији присутног АТП-а. Овај

метод се најчешће користи као контрола хигијене у санитацији прехранбених погона. Резултати брисеви узетих са обележених и третираних површина биће прочитани на апарату MVP ICON® (BIOCONTROL, Италија). Биће припремљена два сета третмана површина (негативна контрола – стерилна површина; суспензија вируса у физиолошком раствору; суспензија вируса и дезинфекционо средство (250 ppm); суспензија вируса и екстракт коре нара (5 mg/mL); суспензија хуманих норовируса у комбинацији са бактеријом *Escherichia coli*), за узорке који ће бити узети методом брисева, и за узорке у којима ће се пратити присуство норовируса методом RT-qPCR.

Узимање брисева са површина помоћу FLASH® методе (алерген индикатор протеин тест) (BIOCONTROL, Италија). FLASH® је протеински визуелни тест који брзо детектује протеинске резидуе на површинама, након санитације. Детекција протеина, након санитације указује на присуство материја биолошког порекла и неодговарајућег поступка санитације. С обзиром да норовируси имају протеински капсид, покушаће се њихова детекција на површинама. Узети брисеви се инкубирају на 25°C и 70°C / 10 min. Концентрација резидуа протеина која се може детектовати на амбијенталној температури је до 20 µg. Већа сензитивност методе се обезбеђује на 70°C чиме је могуће детектовати резидуе протеина у концентрацији од 3 µg.

8. Редукција хуманих норовируса екстрактом коре нара на биолошким површинама (чери парадајз и млади лук)

Површине чери парадајза и младог лука ће бити опране и завршно испране стерилном дејонизованом дестилованом водом, након чега следи стерилизација површина дејством UV светлости. Експеримент ће се изводити у стерилним условима према следећем плану:

Варијанта I: нанети на биолошке површине суспензију вируса, и након сушења додати екстракт коре нара (5 mg/mL) и оставити 1 h на 25°C;

Варијанта II: биолошке површине третирати са екстрактом коре нара, након што се осуши, нанети суспензију вируса и оставити 1 h на 25°C;

Планирана је изолација норовирусне РНК са површина чери парадајза и младог лука директним методом са Trizol™ реагенсом, према наведеном протоколу.

9. Перзистентност хуманих норовируса у симулираним гастро-интестиналним условима и моделу хране испитаће се у:

- фосфатном пуферу (pH 7);
- симулираним гастричним условима (SGF, pH 1.2, Ricca Chemical Company, Ricca Chemical Company, Arlington, САД);
- симулираној интестиналној течности (SIF, pH 7.5, USP XXII formulacija, Ricca Chemical Company, Ricca Chemical Company, Arlington, САД);
- Моделу хране: млеко са ниским садржајем млечне масти (0.5% млечне масти) и природни матични сок од нара (pH 3.2).

Мешавина суспензија хуманих вируса и наведених флуида ће се инкубирати 2 h и 6 h на 37°C. Изабрана времена представљају симулирано време орално конзумираних хранљивих компоненти при проласку кроз гастроинтестинални тракт.

Екстракција вирусне РНК ће се вршити, према упутству произвођача, помоћу кита Rotavirus/Norovirus/Astrovirus Real-TM (Sacace Biotechnologies, Италија) који у свом саставу има и кит за изолацију вирусне РНК.

Млеко као модел хране представља комплексан флуид (протеина, масти и угљених хидрата), из кога ће се РНК изоловати применом два метода:

I сет узорка млека: додаће се 1 µL протеиназе K (Invitrogen Thermo Scientific™, САД), затим загревати 10 min на 37°C (Hennechart-Collette, et. al., 2017), након чега је планирана изолација китом.

II сет узорка млека: директна метода са Trizol™ реагенсом.

10. Квантитативна ланчана реакција полимеразе којој предходи реверзна транскрипција (RT-qPCR)

Метода избора за одређивање присуства хуманих норовируса у различитим узорцима су молекуларне методе као што је RT-qPCR, која у основи представља детекцију изоловане вирусне РНК коришћењем специфичних прајмера. Користиће се различити комерцијални китови према потребама експеримената:

Quantification of Norovirus genotype 1 and 2, (Primer™ Ltd, genesing, UK).

Rotavirus/Norovirus/Astrovirus Real-TM (Sacace Biotechnologies, Италија)

SuperScript™ III Platinum SYBR Green One Step quantitative RT-PCR kit (Invitrogen, Thermo Scientific™, САД)

FastGene® IC Green One Step Mix (Zymo Research, САД)

Forward Primer (GII MON 431: 5' TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA 3') и Reverse Primer (GII MON 433: 5' GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT 3') (Sigma-GenoSys; St. Louis, Missouri, САД).

Користиће се апарати 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems StepOne™, Thermo Scientific™, САД) и Mic Real Time PCR Cycler (Bio Molecular Systems, Аустралија).

11. Трансмисиона електронска микроскопија

Узорци: суспензија хуманих норовируса и мешавина хуманих норовируса и екстракта коре нара 5 mg/mL.

Фиксирање узорака врши се са 2,5% глутар-аледхидом. Фиксирани узорак се наноси на електронмикроскопску мрежицу, након чега се врши обилно испирање са дестилованом водом. После третмана са бојом уранилацетатом (Ultrastain I) користићи EM Stain system (Leica Microsystems, Austria) узорци ће бити прегледани на CM12 Трансмисионом електронском микроскопу (Philips/FEI, Холандија) на 80-kV. Дигиталне слике ће се добити помоћу ITEM MegaView CCD.

12. Статистичка анализа

Статистичка обрада података биће урађена помоћу XLStat и SPSS софтвера, применом одговарајућих статистичких метода.

6. Списак литературе цитиране у тексту пријаве

Списак литературе цитиране у тексту пријаве дат је и Прилогу 1.

7. Списак саопштених и објављених научних и стручних радова

Списак саопштених и објављених научних и стручних радова дат је у Прилогу 2.

8. Биографија кандидата

Ивана Живковић, рођена је 25.08.1990. године у Београду, Република Србија. Основне студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, студијски програм Прехрамбена технологија, модул Управљање безбедношћу и квалитетом у производњи храном, завршила је 18.09.2013.год. Мастер студије на истом факултету, студијски програм Прехрамбена технологија завршила је 17.10.2014. год., одбраном мастер рада под насловом: „Микробиолошки квалитет и безбедност сладоледа“, и са просечном оценом 9.43. Докторске академске студије, на истом факултету, студијски програм Прехрамбена технологија, уписала је 2014 године и положила све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9.71. Ивана Живковић је волонтерски ангажована за извођење практичне наставе од школске 2015/2016 до данас на предметима: Микробиологија хране (трећа година, одсек: Прехрамбена технологија, обавезан предмет на модулу: Управљање безбедношћу и квалитетом у производњи храном); Генетика индустријских микроорганизама (трећа година, одсек: Прехрамбена технологија, обавезан предмет на модулу Микробиологија хране); Општа микробиологија (друга година, обавезан предмет свим студентима на одсеку за Прехрамбену технологију) и Микробиологија (прва година, студијски програм: Зоотехника). Учествовала је на националним и међународним конференцијама, а на FOOD-3 International conference “The challenges for quality and safety along the food chain”, која се одржала у Софији, Бугарска (23-25 март, 2017) са постером под насловом „Antiviral effects of pomegranate peel extracts on human norovirus GII.“ освојила је друго место за најбољи постер са презентацијом на конференцији. Члан је Удружења микробиолога Србије.

9. Закључак и предлог

На основу анализе поднете пријаве докторске дисертације Иване Живковић, под насловом „Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукацију хуманих норовируса *in vitro*“, Комисија сматра да је предложена тема актуелна, иновативна и има научни и примењени значај у области безбедности хране. Хумани норовируси се убрајају међу најзначајније алиментарне патогене, чији је основни пут преноса орално-фекални, контаминираним храном и водом, директним контактом са оболелом особом, као и контактом са контаминираним површинама. Добро преживљавају у веома различитим условима спољашње средине и могу се наћи на бројним површинама које уобичајено долазе у контакт са храном, добро се адсорбују за површину свежих производа, отпорни су на многе еколошке услове средине, третмане који се примењују у прехрамбеној технологији као и на многа средства за дезинфекцију и санитацију која се уобичајено примењују у погонима за прехрамбену индустрију. Дезинфекциона средства на бази хлора/хипохлората су ефикасна према норовирусима, међутим резидуе који настају током њихове употребе представљају ризик по здравље људи, и забрањена су многим земљама Европске Уније у производњи свежег сеченог воћа и поврћа. Уочава се

велики интерес у проналажењу других алтернативних природних антивирусних једињења. Имајући у виду да су сок и кора нара (*Punica granatum* L.), богат извор полифенола, укључујући флавоноиде и танине, екстракт коре нара може представљати значајан природни антивирусни агенс за редукцију хуманих норовируса. Циљ истраживања и хипотезе од којих кандидат полази правилно су постављени. На основу предложеног материјала и метода може се закључити да је експериментални приступ свеобухватан и систематичан.

На основу наведеног, Комисија позитивно оцењује поднету пријаву и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати и одобри израду докторске дисертације Иване Живковић, под насловом: **„Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*“**. Као ментора при изради ове дисертације, комисија предлаже др Драгославу Радин, редовног професора Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

Чланови Комисије:

Др Драгослава Радин, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
(ужа научна област: Технолошка микробиологија)

Др Бранка Крстић, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
(ужа научна област: Фитопатологија)

Др Катарина Шавикин, научни саветник
Институт за проучавање лековитог биља „Др. Јосиф Панчић“, Београд
(ужа научна област: Фармакогнозија)

Прилог 1. Списак литературе цитиране у тексту пријаве

- Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Graham, D. Y. (2008): Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1553–1557.
- Богићевић, Д., Радин, Д., Велебит, Б., Радин, С., Лековић, З., Лекић, Н., Лекић, Д., Радловић, Н. (2014): Клиничке карактеристике акутног дијареалног поремећаја изазваног норовирусом – прва искуства у Србији. In: Зборник сажетака, Други конгрес педијатара Србије са међународним учешћем. Београд, Србија, стр. 30.
- Burke, R., Shah, M., Wikswo, M., Barclay, L., Kambhampati, A., Marsh, Z., Cannon, J., Parashar, U., Vinjé, J., Hall, A. (2019): The Norovirus Epidemiologic Triad: Predictors of severe outcomes in US Norovirus outbreaks, 2009–2016. *The Journal of Infectious Diseases* 219: 1364–1372.
- EFSA/ECDC. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. (2018): *EFSA Journal*, 16:12.
- European Pharmacopoeia. (2011): 7th ed. Strasbourg: Council of Europe.
- Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Fraisse A., Perelle, S. (2017): Comparison of three extraction methods to detect noroviruses in dairy products. *Food Microbiology* 61: 113-119.
- Howell, A. B., D'Souza, D. H. (2013): The pomegranate: Effects on bacteria and viruses that influence human health. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 1-11.
- Jovanovic, A., Petrovic, P., Đordjevic, V., Zdunic, G., Savikin, K. Bugarski, B. (2017): Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine* 37: 45-49.
- Kamimoto, M., Nakai, Y., Tsuji, T., Shimamoto, T., Shimamoto, T. (2014): Antiviral effects of persimmon extract on human Norovirus and its surrogate, bacteriophage MS2. *Journal of Food Science* 79.
- Knight, A., Haines, J., Stals, A., Li, D., Uyttendaele, M., Knight, A., Jaykus, L. A. (2016): A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *International Journal of Food Microbiology* 216: 40–49.
- Kotwal, G., Cannon, J. (2014): Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current Opinion in Virology* 4: 37-43.
- Li, D., Baert, L., Zhang, D., Xia, M., Zhong, W., Van Coillie, E., Jiang, X., Uyttendaele, M. (2012): Effect of grape seed extract on human norovirus GII.4 and murine norovirus 1 in viral suspensions, on stainless steel discs, and in lettuce wash water. *Applied and Environmental Microbiology* 78:7572–7578.
- Papapanagiotou, E.P. (2017): Foodborne Norovirus state of affairs in the EU rapid alert system for food and feed. *Veterinary Sciences* 4: 1-61.
- Radin, D. (2012): Human norovirus transmission due to contaminated fresh fruit and vegetables. *Archives of Biological Sciences* 64: 1405–1412.
- Radin, D. (2013): Significance and molecular detection of noroviruses in fresh produce. In: Méndez-Vilas A., editor. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Formatex Research Center, Badajoz, 1893-1904.
- Radin, D., D'Souza, D.H. (2011a): Evaluation of two primer sets using newly developed internal amplification controls for rapid human norovirus detection by SYBR Green I based real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology* 3: 61-69.

- Radin, D., D'Souza, D. H. (2011b): Simple and Rapid Detection of Human Norovirus from Produce Using SYBR Green I-based Real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology* 3: 121–129.
- Sundararajan, A., Ganapathy, R., Huan, L., Dunlap, J.R., Webby, R.J., Kotwal, G.J., Sangster, M.Y. (2010): Influenza virus variation in susceptibility to inactivation by pomegranate polyphenols is determined by envelope glycoproteins. *Antiviral research* 88:1-9.
- Vinje, J. (2015): Advances in laboratory methods for detection and typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 53: 373-381.
- Waterman, P.G., Mole, S. (1994): Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific Publication.

Прилог 2. Списак саопштених и објављених научних и стручних радова

1. **Živković, I.**, Šavikin, K., Zdunić, G., Živković, J., Bigović, D., Menković, N., Radin, D. (2018): Antiviral activity of medicinal plants extracts against foodborne norovirus. *Lekovite sirovine*, 38: 31-34. <http://dx.doi.org/10.5937/leksir1838031Z>
2. **Živković, I.**, Lazić, D., Radin, D., (2018): Perzistentnost humanog norovirusa genogrupe II u simuliranim gastrointestinalnim uslovima i modelu hrane. In: Obradović, D. Ranin, L. (Eds.) *Zbornik apstrakata XII Kongresa mikrobiologa Srbije sa međunarodnim učešćem – MIKROMED 2018 REGIO*. Beograd, Srbija. pp. 240-241. ISBN: 978-86-914897-5-5
3. Radin, D., **Živković, I.**, Šavikin, K., Velebit, B., Zdunić, G., Janković, T. (2017): Antivirusni potencijal ekstrakta kore nara za redukciju humanog norovirusa GII na površinama. In: Obradović, D., Ranin, L. (Eds.) *Knjiga apstrakata XI Kongresa mikrobiologa Srbije sa međunarodnim učešćem – MIKROMED 2017*. Beograd, Srbija, pp. 209 – 210. ISBN 978-86-914897-4-8
4. **Živkovic, I.**, Savikin, K., Zivkovic, J., Bigovic, D., Velebit, B., Radin, D. (2017): Antiviral effects of pomegranate peel extracts on human norovirus GII. *FOOD-3 International conference “The challenges for quality and safety along the food chain”*, Food 3-37 *FOOD AND BEVERAGES QUALITY AND SAFETY (FBQS)*. Contract No 1195/2017, Abstract book, 39-40.
5. Radin, D., **Živkovic, I.** (2016): The influence of the food surface and matrix on norovirus detection by RT-qPCR. In: Đuragić, O. (Ed.) *Proceedings of the III International Congress Food Technology, Quality and Safety*. Novi Sad, Serbia. pp. 300-305. ISBN 978-86-7994-050-6
6. **Živkovic, I.**, Radin, I., Savikin, K., Bigovic, D., Velebit, B., Radin, D. (2016): Optimization of RT-qPCR assay for evaluation of antiviral effects of medicinal plant extracts. In: Stikic, R. (Ed.) *Programme and Abstracts of the International Conference State-of-the-Art Technologies: Challenge for the Research in Agricultural and Food Sciences*. Belgrade, Serbia. p. 133. ISBN 978-86-7834-247-9

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

Име и презиме: Драгослава Радин

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Živković, I., Šavikin, K., Zdunić, G., Živković, J., Bigović, D., Menković, N., **Radin, D.** (2018): Antiviral activity of medicinal plants extracts against foodborne norovirus. *Lekovite sirovine*, 38: 31-34.
2. **Radin, D.** (2014): New trends in food- and waterborne viral outbreaks. *Archives of Biological Sciences* 66: 1-9.
3. **Radin, D.** (2012): Human norovirus transmission due to contaminated fresh fruit and vegetables. *Archives of Biological Sciences* 64: 1405–1412.
4. **Radin, D.**, D'Souza, D.H. (2011): Evaluation of two primer sets using newly developed internal amplification controls for rapid human norovirus detection by SYBR Green I based real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology* 3: 61-69.
5. **Radin, D.**, D'Souza, D. H. (2011): Simple and rapid detection of human Norovirus from produce using SYBR Green I-based real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology* 3: 121–129.