

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број захтева: 32/9-8.3.

Датум: 29.06.2022.

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији
за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

Кандидат **ИВАНА (Милан) ЖИВКОВИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавила је докторску дисертацију под називом: „Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*“

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 08.10.2019. године, својим актом 02-08 Број: 61206-3952/2-19 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **«Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*»**.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 30.03.2022. године, одлуком Факултета број 32/6-6.2. у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Драгослава Радин, редовни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Ивана Станковић, редовни професор, Фитопатологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Дубравка Биговић, виши научни сарадник, Биљна биотехнологија, Институт за проучавање лековитог биља „Др. Јосиф Панчић“ у Београду,
4. др Зорица Радуловић, редовни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
5. Милена Пантић, ванредни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 29.06.2022. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА
Проф. др Душан Живковић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/9-8.3.
Датум: 29.06.2022. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 29.06.2022. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **ИВАНА ЖИВКОВИЋ, мастер** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«ЕКСТРАКТ КОРЕ НАРА (*Punica granatum* L.) КАО ПРИРОДНИ АНТИВИРУСНИ АГЕНС ЗА РЕДУКЦИЈУ ХУМАНИХ НОРОВИРУСА *in vitro*».**

II Универзитет је дана 08.10.2019. године, актом 02-08 број: 61206-3952/2-19, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у научном часопису који га квалификује за одбрану докторске дисертације:

Živković, I., Šavikin, K., Živković, J., Zdunić, G., Janković, T., Lazić, D., Radin, D. (2021). Antiviral Effects of Pomegranate Peel Extracts on Human Norovirus in Food Models and Simulated Gastrointestinal Fluids. *Plant Foods for Human Nutrition* 76 (2), 203–209.

<https://doi.org/10.1007/s11130-021-00895-7>

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

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

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Иване Живковић, магистар инжењерства.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, број 32/6-6.2. од 30.03.2022. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: „Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*“, кандидата Иване Живковић, магистар инжењерства, па пошто смо проучили завршену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Иване Живковић, магистар инжењерства, написана је на 101 страни, укључујући 10 табела, 7 графика, 29 слика, а цитирано је 380 референци изворне научне литературе. Дисертација садржи сажетак са кључним речима на српском и енглеском језику.

Дисертација садржи следећих 7 поглавља: 1. Увод (стр. 1-3), 2. Преглед литературе (стр. 4-27), 3. Циљ истраживања (стр. 28), 4. Материјал и методе (стр. 29-45), 5. Резултати истраживања и дискусија (стр. 46-70), 6. Закључак (стр. 71-73), 7. Литература (стр. 74-101). На крају текста дисертације налазе се Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије рада, Изјава о коришћењу и Биографија кандидата.

2. Приказ и анализа дисертације

Увод – У овом поглављу кандидаткиња је дала кратак приказ значаја вируса који се преносе храном, који без обзира што се у храни не умножавају, представљају озбиљан проблем за здравље људи. С обзиром да се веома добро и лако преносе храном, вируси представљају приоритет прехранбене индустрије, на шта указују и стручњаци који се баве проценом ризика и идентификацијом приоритета безбедности хране. Вируси који се најчешће повезују са преносом путем хране су хумани норовируси и хепатитис А вирус. Генерално се сматра, да су вируси који се преносе храном стабилни у различитим еколошким условима, могу преживети неповољне услове као што су на пример ниске рН вредности као и услове гастроинтестиналног тракта. Поред наведеног, имају ниске инфективне дозе, што у комбинацији са чињеницом да не утичу на састав хране нити њене сензорне карактеристике, представља значајан моменат за безбедност хране.

Кандидаткиња истиче значај глобализације промета хране, која утиче на квалитет и безбедност нарочито свежих производа (воће и поврће) указујући и на производњу малине по којој је Србија позната, а раније се често јављала у нотификацијама Европског система брзог упозорења за храну и храну за животиње, које се односе на контаминацију малине овим вирусима.

На основу података Центра за контролу болести, у Сједињеним Америчким Државама хумани норовируси проузрокује 58 % алиментарних обољења. Слични подаци се наводе и за земље Европске Уније, где је највећи број алиментарних епидемија регистрованих 2018. год. био проузрокован хуманим норовирусом, хепатитис А вирусом и бактеријом рода *Salmonella*. У Србији, епидемије проузроковане норовирусима региструју се на територији Београда од 2010. год, а у периоду 2012-2016 су се јављале сваке године у свим старосним категоријама. На подручју Војводине, норовирус је доминантан узрочник епидемија дијареја нарочито код особа старијих од 20 година.

У производњи хране, најефикаснија дезинфекциона средства у борби против контаминације вирусима су једињења на бази хлора, али је потребно применити већу концентрацију него што је потребно да се униште бактеријски контаминенти. Међутим, ова једињења представљају здравствену опасност, због образовања токсичних резидуа током примене, нарочито ако се користе у производњи свежег воћа и поврћа. Последњих година се интензивно проучава примена природних антимикробних једињења пореклом из екстраката лековитих биљака.

Преглед литературе – Ово поглавље састоји се од четири потпоглавља. У првом потпоглављу Карактеристике хуманог нотовируса, кандидаткиња је детаљно приказала откриће овог вируса, затим морфологију и организацију генома, експресију гена и репликацију, класификацију, таксономију и разносврност, њихову резистентност и перзистентност као и путеве преноса, епидемиолошке податке и клиничку слику норовирусне епидемије. Хумани норовируси су најчешћи агенс 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. Норовируси се убрајају међу најзначајније алиментарне патогене, мада је њихова детекција у храни отежана због комплексног матрикса самог производа, неравномерне распоређености и присутности честица у малом броју.

Вируси рода *Norovirus*, припадају породици *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 на 5' крају а на 3' крају налази се поли(А) реп. Геном величине 7.6 kb, је организован у три отворена оквира читања (open reading frame - ORF), који кодирају осам вирусних протеина. ОРФ-1 кодира полипротеин који се протеолитички преводи у шест неструктурних протеина, укључујући норовирусну протеазу и РНК-зависну-РНК полимеразу. ОРФ-2 и ОРФ-3 кодирају структурне компоненте вириона, и то ОРФ-2 протеине капсида а ОРФ-3 мање структурне протеине који су важни за стабилност протеина капсида. Генетски су веома разноврсни и групушу се у седам геногрупа (GI-GVII) и више од 40 генотипова. Геногрупе GI, GII, GIV

и GVII обухватају хумане генотипове, док су GI и GII најчешће повезане са хуманим обољењима. Доминантан генотип који најчешће изазива епидемије широм света је GII.4. 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. 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.

Друго потпоглавље је посвећено карактеристикама нара (*Punica granatum* L.) у коме је кандидаткиња исцрпно обухватила потенцијал примене плода нара, производа од нара као природних адитива и функционалне хране, хемијски састав нара и антимикуробни потенцијал коре плода нара и њеног екстракта, као и преглед испитивања физиолошке активности екстракта коре плода нара. Нар је значајан, јер су сок и кора плода богат извор полифенола, укључујући флавоноиде и танине, а најважније биоактивне компоненте су пуникалагини и пуникалини. Водени екстракт коре плода нара показује активност према *Escherichia coli* O157:H7, метанолни екстракт инхибира формирање биофилмова *Staphylococcus aureus*, а пречишћен екстракт инхибира репликацију вируса инфлуенце и ХИВ-1. 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 антимикуробних једињења са фармацеутским значајем или за примену у санитацији.

У трећем потпоглављу кандидаткиња је дала краћи општи приказ антимикуробног потенцијала екстракта лековитих биљака, док су у четвртом потпоглављу истакнута важна питања везана за дезинфекцију и санитацију површина које долазе у контакт са храном. Посебан осврт је дат о отпорности хуманих норовируса према деловању различитих дезинфекционих средстава. Средства на бази хлора су ефикасна за редукцију норовируса, али је препорука да се користе веће концентрације слободног хлора за површине које долазе у контакт са храном у прехранбеној индустрији. Међутим, употребом дезинфекциона средства на бази хлора/хипохлората, настају резидуе које 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.

Циљ истраживања – Хумани норовируси се убрајају међу најзначајније патогене који се преносе храном и контаминираним површинама које долазе у контакт са храном. Њихова резистентност према многим дезинфекционим средствима која се уобичајено користе у погонима прехранбене индустрије, представља значајан проблем. Додатно оптерећење представља чињеница да средства на бази хлора која су ефикасна за редукцију хуманих норовируса, стварају резидуе које представљају ризик по здравље људи. На основу наведеног, кандидаткиња је дефинисала следеће циљеве докторске дисертације:

- Одабир одговарајућег екстракта, међу 11 тестираних биљних врста, за редукцију хуманог норовируса у *in vitro* условима. На основу постигнуте редукције броја честица норовируса и минималне инхибиторне активности на процесе детекције, одабран је екстракт коре плода нара.

- Утврђивање концентрације биоактивних компоненти екстракта коре плода нара и комерцијално доступног матичног сока од нара.
- Тестирање антивирусног потенцијала екстракта коре плода нара за редукцију хуманог норовируса у суспензији (фосфатни пуфер) на температурама 25 и 37 °C.
- Испитивање антивирусног ефекта екстракта коре плода нара у симулираним гастричним и интестиналним условима.
- Испитивање антивирусног ефекта екстракта коре плода нара на различитим моделима хране (матични сок нара, млеко, млади лук, чери парадајз).
- Тестирање антивирусног потенцијала екстракта коре плода нара за редукцију хуманог норовируса на површинама/материјалима (нерђајући челик и пластика) који најчешће долазе у контакт са храном.
- Тестирање ефикасности екстракта коре плода нара за редукцију хуманог норовируса на биолошким површинама свежег поврћа.
- Анализа честица хуманог норовируса у суспензији и после третмана са екстрактом коре плода нара, применом трансмисионе микроскопије.
- Квантификација честица норовируса после примене комерцијалних дезинфекционих средстава на бази хлора.
- Праћење мешане бактеријске и вирусне контаминације на различитим површинама након примене различитих средстава за дезинфекцију. Примена брзе методе детекције АТП за бактеријске контаминенте, а RT-qPCR за детекцију вируса.
- Испитивање могућности примене алерген индикатор протеин теста - FLASH методе за детекцију честица норовируса на површинама које долазе у контакт са храном.

Материјал и методе – Ово поглавље кандидаткиња је приказала у 7 потпоглавља, у којима је наведен материјал и методе које су коришћење за рад у докторској дисертацији. Почетни материјал обезбеђен је у сарадњи са Универзитетском дечијом клиником Тиршова, Београд. Узорци фецеса пацијената оболелих од акутног вирусног гастроентеритиса сакупљани су у дужем временском периоду а затим је извршена идентификација норовируса у Лабораторији за генетику Катедре за технолошку микробиологију Пољопривредног факултета. Квантификација норовирусних геномских еквивалената по μL урађена је у 1 % суспензији методом апсолутне квантификације, применом комерцијалног кита Quantification of Norovirus genotype 1 and 2, Primer Design™ Ltd (Genesig, Велика Британија).

Припрема и хемијска карактеризација екстракта одабраних лековитих биљака (*Sideritis raeseri*; *Gentiana asclepiadea*; *Aronia melanocarpa*; *Gentiana lutea*; *Helichrysum plicatum*; *Hypericum perforatum*; *Aronia melanocarpa*; *Satureja subspicata*; *Mahonia aquifolia*; *Punica granatum*; *Vitis vinifera* var. *Prokupac*) урађена је у сарадњи са Институтом за проучавање лековитог биља „Др. Јосиф Панчић“, Београд. Укупан садржај фенола екстракта коре плода нара анализиран је спектрофотометријски коришћењем модификоване Folin Ciocalteu методе, док је садржај танинским материја одређен на основу Европске фармакопеје 7.0. Одређивање садржаја биоактивних компоненти (пуникалагин, пуникалин, гална и елагна киселина) екстракта коре плода нара и матичног сока плода нара рађено је применом HPLC методе (Agilent 1200 RR, Valdbron, Немачка).

У потпоглављу посвећеном методама испитивања антивирусног ефекта екстракта коре плода нара и поређење са комерцијалним дезинфекционим средствима, кандидаткиња је

врло детаљно приказала третман норовируса екстрактима лековитог биља у *in vitro* условима, као и третман различитим концентрацијама екстракта коре плода нара. Врло значајан сегмент представља одређивање перзистентности хуманих норовируса у симулираним гастроинтестиналним условима и моделу хране, без и са додавањем екстракта коре плода нара. У свим наведеним експериментима у овом потпоглављу велика пажња је посвећена одговарајућој изолацији вирусне РНК, додавањем екстракционе контроле у сваки узорак пре почетка изолације, како би се избегли губици и добили поновљиви резултати. Екстракција норовирусне РНК вршена је помоћу кита Ribo-Sorb (AmpliSens®, Русија). Приликом одређивања антивирусног деловања екстракта на редукцију норовируса на различитим површинама (свеже поврће, нерђајући челик, пластика), због специфичности експеримента примењен је модификовани директан метод изолације вирусне РНК Trizol реагенсом (Thermo Scientific™, САД).

У потпоглављу посвећеном молекуларној методи квантитативна ланчана реакција полимеразе којој предходи реверзна транскрипција (RT-qPCR), која представља основ детекције и квантификације вируса, кандидаткиња је на изразито добар начин табеларно представила различите реакционе смеше, протоколе реакције као и уређаје који су коришћени у различитим изведеним експериментима.

Трансмисиона електронска микроскопија је урађена помоћу Leica EM Stain (Microsystems, Аустрија) SM 12 TEM (Philips/FEI, Холандија) на 80 kV, коришћењем iTEM MegaView CCD камере.

Статистичка анализа и обрада података урађена је коришћењем програма SPSS 23 (IBM, САД). Поређење разлике између средњих вредности вршена је применом Студентовог t-теста, док је за поређење између више група, примењена једносмерна анализа варијансе ANOVA и Tukey post-hoc тест. Статистичка значајност је анализирана на ниову: $p < 0,05$.

Резултати истраживања и дискусија – Ово поглавље кандидаткиња је систематизовала у 8 потпоглавља. У потпоглављу Квантификација хуманих норовируса у суспензији одређен је број хуманих норовируса у 1 % суспензији (фосфатни пуферни раствор) и износио је $6 \log_{10} \text{ GE} / \mu\text{L}$. У потпоглављу Антивирусни потенцијал екстракта лековитих биљака треба истаћи редукцију хуманог норовируса $> 1 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ применом концентрације 1 mg/mL екстракта листа *Aronia melanocarpa*, екстракта упареног вина Прокупац и екстрактом *Hypericum perforatum*. Неки од екстраката као што су *Hypericum perforatum*, плод *Aronia melanocarpa* и *Punica granatum* кора плода, показали су бољу редукцију норовируса, када су прво растворени у мешавини 30 % EtOH са 5 % DMSO ($p < 0,05$). Најновији подаци указују на значајне антивирусне ефекте екстракта *Hypericum perforatum* у циклусу SARS-CoV-2 инфекције. *Aronia melanocarpa* је последњих година доживела експанзију популарности због антиоксидативног, антиинфламаторног и антимуtagenог ефекта. На основу доступне литературе, резултати приказани у дисертацији су први објављени резултати о антиноровирусној активности екстракта *Aronia melanocarpa*. Такође, добијена антиноровирусна активност екстракта црног вина аутохтоне сорте винове лозе Прокупац, представља прве објављене резултате. Ресвератрол, као састојак црвеног вина, је полифенолно једињење које је показало антивирусни ефекат у *in vitro* и *in vivo* условима. Добијена антиноровирусна активност је у складу са истраживањима других аутора да црвено вино и ресвератрол имају антивирусно дејство на сурогате норовируса (MNV-1 и FCV) у почетном стадијуму инфекције. На основу редукције вируса, формирања талоба и

инхибиторног утицаја на RT-qPCR у понављањима без додатног пречишћавања вирусне РНК после третмана, изабран је екстракт коре плода нара за даља истраживања. У потпоглављу Хемијска анализа екстракта коре и матичног сока плода нара, приказани су резултати спектрофотометријске анализе - висок садржај фенола 320,16 mg GAE/g и танина 17,37 %. HPLC анализом одређене су доминантне активне компоненте: пуникалин (197,13 mg/g) и пуникалагин (86,93 mg/g). У комерцијалном матичном соку од плода нара, декларисан као 100 % природни сок без додатака, концентрације доминантних биоактивних компоненти су биле знатно ниже: 86,93 mg/g (пуникалин) и 43,23 mg/g (пуникалагин) у односу на екстракт. Неки аутори наводе да концентрација пуникалагина може бити и до $8 \times$ мања у индустријски произведеном 100 % соку од нара у односу на природно цеђени. Ниже концентрације биоактивних једињења рефлектовале су се на мању редукција норовируса у поређењу са екстрактом коре плода нара.

У оквиру потпоглавља Антивирусни потенцијал екстракта коре плода нара у *in vitro* условима, прво је испитан антивирусни ефекат екстракта на редукцију норовируса у суспензији. Испитиване су две концентрације екстракта 2 и 5 mg/mL на две температуре третмана 25 и 37 °C у току 1 h, и редукција је износила: на 37 °C $1,32 \pm 0,06$ (2 mg/mL) и $2,4 \pm 0,09$ (5 mg/mL) $\log_{10}$ GE/ μ L ($p < 0,05$), а на 25 °C $1,22 \pm 0,01$ (2 mg/mL) и $2,04 \pm 0,05$ $\log_{10}$ GE/ μ L (5 mg/mL). На основу добијених резултата закључено је да нема статистички значајне разлике међу истим третманима на различитим температурама, тј. интервал 25 – 37 °C не утиче статистички значајно на редукцију норовируса нити повећава дејство екстракта у току 1 h ($p > 0,05$). Испитивана је перзистентност хуманих норовируса у млеку као моделу хране, које због комплексности састава може имати протективни ефекат приликом деловања екстракта. Установљено је да је у млеку, био смањен антивирусни ефекат екстракта за 20 % после 1, 2 и 6 h у поређењу са редукцијом постигнутом у фосфатном пуферу. Ова појава се објашњава интеракцијом биоактивних једињења екстракта са компонентама из млека. Део истраживања обухватио је и утицај ниске рН вредности на антивирусни потенцијал екстракта. Испитана је перзистентност норовируса и антивирусна ефикасност екстракта у симулираним гастричним (рН 1,3) и интестиналним (рН 7,5) условима. Хумани норовируси се умножавају у гастроинтестиналном тракту, због чега се претпоставило да ниска рН вредност неће имати утицаја на редукцију вируса. Суспензије вируса су инкубиране на 37 °C у току 2 и 6 h. Наведена инкубациона времена су одабрана како би се симулирало време проласка орално конзумираних компонената кроз гастроинтестинални тракт. У поређењу са контролом, утицај рН вредности на смањење броја честица вируса није статистички значајан. Међутим, ниске рН вредности су неповољно утицале после 6 h деловања, и смањиле антивирусну активност екстракта коре плода нара.

Редукција хуманог норовируса на површини свежег поврћа је изузетно савремена тема. На основу добијених резултата установљено је да се много боља редукција норовируса постиже када се прво превентивно нанесе екстракт (5 mg/mL) на површину свежег поврћа а после тога изврши контаминација истих површина суспензијом вируса ($5 \log_{10}$ GE/ μ L). Детектоване резидуалне вирусне честице су биле на нивоу $1,18 \pm 0,06$ (чери парадајз) и $1,30 \pm 0,12$ (млади лук) $\log_{10}$ GE ($p < 0,05$).

Следећи логичан ток, приказани су резултати потпоглавља Редукција хуманих норовируса на површинама које долазе у контакт са храном, с обзиром да су различити типови површина значајан пут преноса вируса. Нерђајући челик и пластика су изабрани као

репрезентативне површине, и суспензија норовируса ($5 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$) је нанета на стерилне површине које су затим третиране екстрактом (5 mg/mL) у току 1 h. За обе испитиване површине остварена је статистички значајна редукција норовируса, и резидуални број честица је био $1,75 \pm 0,01$ (нерђајући челик) и $2,68 \pm 0,04 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ (пластика) ($p < 0,05$). Изражено у процентима, може се рећи да екстракт коре плода нара има способност редукције 99 % честица норовируса на испитиваним површинама. Важно је истаћи да се према Codex Alimentarius-у (2012) ефикасним биоцидом сматра средство које редукује титар инфективних вируса $> 3 \log_{10}$. Према Агенцији за заштиту спољашње средине (EPA, 2019, САД) и Европском стандарду за дезинфекцију (EN 14476:2015) ефикасним дезинфекционим средством се сматра средство које може да оствари инаktivацију на површинама (нерђајући челик, пластика, подови, ножеви и др.) на нивоу $4 \log_{10} \text{ GE}$ (99,99%) при времену контакта које није дуже од 60 минута на собној температури.

У оквиру ових истраживања проверена је ефикасност санитације према мешаној (бактерије и вируси) контаминацији на површинама, комерцијалним дезинфекционим средствима, применом MVP ICON и RT-qPCR методе. Метод *Lightning MVP ICON*[®] је део НАССР система за праћење индикатора квалитета хигијене површина, руку или течности, а заснива се на детекцији АТП молекула, који се сматра добрим индикатором за проверу правилно изведеног поступка санитације. Такође, покушано је да се применом FLASH[®] алерген индикатор протеин теста (BioControl Systems, САД), изврши детекција честица вируса на површини од нерђајућег челика. Овај тест омогућава лаку и једноставну визуелну детекцију присуства протеина, јер се позитивном реакцијом сматра промена боје течности у коју је уруњен брис који се користи за узорковање површина. За детекцију протеина чија је концентрација мања од $3 \mu\text{g}$, сензитивност теста се повећава инкубацијом брисева 10 мин на 70°C . Тест је показао позитиван резултат за узорак са површине на којој је била нанета суспензија норовируса у концентрацији $10^6 \text{ GE}/\mu\text{L}$.

Закључак – Кандидаткиња је извела већи број закључака који се могу представити следећим конкретним најважнијим резултатима:

- У суспензији хуманих норовируса, припремљеној из фецеса деце оболеле од акутног небактеријског гастроентеритиса, апсолутном квантификацијом одређена је њихова концентрација која је износила $6 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$.
- Антиноровирусни потенцијал 11 екстракта лековитих биљака тестиран је у минималним концентрацијама (0,2; 1,0; 2,5 mg/mL). Редукција хуманих норовируса у интервалу од 0,5 - $1 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ добијена је са екстрактима ароније (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, Rosaceae), кантариона (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae), коре плода нара (*Punica granatum* L.) и упареног вина Прокупац.
- Анализом екстракта коре плода нара утврђен укупан садржај фенола ($320,16 \text{ mg GAE/g}$) и укупан садржај танина ($17,37 \pm 0,64 \%$). Доминантне биолошки активне компоненте су детектоване у високој концентрацији: пуникалин $197,13 \text{ mg/g}$, пуникалагин 54 mg/g , елагна $25,42 \pm 0,80 \text{ mg/g}$ и гална киселина $6,83 \pm 0,53 \text{ mg/g}$.
- У матичном соку од плода нара укупан садржај фенола износио је $146 \pm 2,01 \text{ mg GAE}/100 \text{ mL}$ сока и укупан садржај танина $5,21 \pm 0,22\%$. Биолошки активна једињења из матичног сока нара детектована су у статистички значајно нижој концентрацији у односу на екстракт коре плода нара, изузев концентрација галне киселине која се није статистички значајно разликовала ($p < 0,05$).

- Антивирусна ефикасност екстракта коре плода нара у суспензији испитана је у концентрацијама 2 и 5 mg/mL, на температурама 25 и 37 °C. У оквиру тестирања истих концентрација, није забележена статистички значајна разлика антивирусног деловања екстракта ($p < 0.05$) на различитим температурама.
- Екстракт коре плода нара (5 mg/mL) редуковао је хумане норовирусе у суспензији за $2,41 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ након 1 h, док је највећу активност постигао након 6 h деловања редукујући број честица норовируса за $3,38 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$).
- Перзистентност хуманих норовируса испитана је у фосфатном пуферу (pH 7,2), млеку са ниским садржајем млечне масти (pH 6,8), симулираним гастричним (pH 1,2) и интестиналним (pH 7,5) условима. Наведене течности нису утицале на редукцију хуманих норовируса, док је додатак екстракта коре плода нара (5 mg/mL) показао значајан антивирусни ефекат и редукцију хуманих норовируса за 99 % у фосфатном пуферу (време инкубације 2 и 6 h), симулираним гастричним (2 h) и интестиналним (6 h) условима, док је у млеку редукција била на нивоу 91 %. Матични сок од нара (pH 3,3) редуковао је број честица хуманих норовируса за 97%.
- Способност екстракта коре плода нара да редукује хумане норовирусе на површинама свежег чери парадајза и младог лука за 99% је од великог значаја јер се ови производи најчешће користе свежи без примене термичког третмана. Утврђено је да начин апликације екстракта коре плода нара на површину поврћа, статистички значајно утиче на редукцију хуманих норовируса, која је већа када се прво нанесе екстракт па затим вирус.
- Антивирусни потенцијал екстракта коре плода нара на површинама од нерђајућег челика и пластике је значајан. Редукција броја честица норовируса је била већа од $3 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$, што је у складу са захтевом Codex Alimentarius-a, како би се могло сматрати да је дезинфекционо средство ефикасно против вируса.
- Трансмисиона електронска микроскопија је потврдила антивирусни потенцијал екстракта коре плода нара, јер су у третираним узорцима, у поређењу са нетретираном контролом, вирусне честице биле потпуно дезинтегрисане.
- Дезинфекциона средства на бази хипохлорита показала су се ефикасна за редукцију хуманих норовируса. Концентровано средство је редуковало број честица норовируса за више од $3 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$, међутим, уочено је оштећење површина од нерђајућег челика. Комерцијално концентровано биоцидно средство на бази дибензил амонијум хлорида, декларисано да редукује 99,99% микроорганизама, није било ефикасно за редукцију норовируса.
- Провера санитације вештачки контаминираних површина мешавином суспензија колиформне бактерије *Escherichia coli* (10^7 CFU/mL) и хуманих норовируса ($10^6 \text{ GE}/\mu\text{L}$) урађена је применом брзог АТП биолуминисцентног теста и RT-qPCR методом. После дезинфекције површина од пластике и нерђајућег челика средством на бази хипохлорита (250 ppm и концентровано 4,5g/100g), резултати добијени АТП тестом су очитани на граници зоне упозорења. После примене дезинфекционог средства на бази дибензил амонијум хлорида (0,75/100g) брзим АТП тестом површине су детектоване у зони која захтева поновну санитацију. Присуство хуманих норовируса на површинама, потврђено је RT-qPCR методом, после дезинфекције са натријум хипохлоритом на новоу $2,2 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ (нерђајући челик) и $2,38 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$

(пластика), док је после примене дибензил амонијум хлорида детектована висока концентрација хуманих норовируса на нивоу 3,9 и 3,75 log₁₀ GE/μL.

- У циљу провере могућности примене FLASH® алерген индикатор протеин теста, на стерилне површине нерђајућег челика нанете су различите концентрације хуманих норовируса (10³-10⁶ GE/μL). Извршено је узорковање површина специјалним брисевима из теста. Тест се заснива на визуелној детекцији која се манифестује променом боје течности у којој се инкубира узети брис (зелена боја – није детектовано присуство протеина, до различитих нијанси љубичасте – детектовано присуство протеина). Брисеви узети са површина на којима је била нанета највећа концентрација норовируса показали позитиван резултат, тј. детектована је промена боје у тамно љубичасто.
- Може се закључити да је у докторској дисертацији извршена хемијска карактеризација екстракта коре плода нара и матичног сока од плода нара (садржај укупних фенола и танина, садржај пуникалагина, пуникалина, галне и елагне киселине). Показано је да екстракт коре плода нара има већи садржај одређиваних фенолних компоненти и већи антивирусни потенцијал на норовирус и то указује на могућу позитивну корелацију између садржаја фенолних компоненти у екстракту/соку и његове антивирусне активности. Хемијски профил и испољене активности екстракта потврђују примену екстракта коре плода нара (*Punica granatum* L.) у исхрани. Такође, ова истраживања отварају врата новим подручјима примене екстракта коре плода нара у санитацији намирница у циљу смањења биохазарда и представљају добру основу за наредна истраживања.

Литература – У дисертацији је на правилан начин наведено 380 научних извора који су актуелни и одговарају проблематици која је изучавана.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација Иване Живковић, маг. инж., под насловом „Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*“, према мишљењу Комисије, урађена је према одобреној пријави теме и представља оригинално и самостално научно-истраживачко дело.

У Уводу и Прегледу литературе кандидаткиња је детаљно анализирила литературне податке из области истраживања докторске дисертације. На основу прегледа литературе циљеви истраживања су правилно дефинисани и постављени.

Програмом ове дисертације обухваћено је испитивање антивирусног потенцијала екстракта лековитих биљака, међу којима је изабран екстракт коре плода нара, за детаљну анализу у погледу редукције хуманих норовируса. Испољене активности екстракта коре плода нара у различитим условима (температуре, концентрације, симулирани гастрични и интестинални услови), и моделу хране (млеко са смањеним садржајем масти, свеже поврће - млади лук и чери паарадајз) потврђују његову примену у исхрани. Резултати добијени у овим истраживањима указују на могућност примене екстракта коре плода нара у санитацији неких категорија прехранбених производа као и површина које долазе у контакт са храном, у циљу производње безбедне хране.

Методе примењене у експерименталном делу докторске дисертације су савремене, адекватне и правилно изабране, што је омогућило кандидаткињи проверу постављених

хипотеза, добијање поузданих резултата истраживања и остваривање постављених циљева истраживања. Резултати су прегледно приказани, правилно анализирани и упоређени са резултатима других аутора. Закључци су правилно изведени, у сагласности су са добијеним резултатима и вођеном дискусијом.

Закључујемо да ова дисертација представља научну целину испитивања антивирусног потенцијала екстракта коре плода нара за редукцију хуманих норовируса у различитим условима, срединама и моделима хране. Сматрамо да је проблематика коју је кандидаткиња обрадила и експериментално испитала у поднетој дисертацији веома значајна, а добијени резултати и њихово тумачење представљају научни допринос пољу безбедности хране, и примењени допринос који преко хемијског профила и остварене активност екстракта коре плода нара иду у прилог његовој примени у исхрани.

Имајући у виду остварене резултате, Комисија предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да усвоји позитивну оцену докторске дисертације Иване Живковић, маг. инж., под насловом: „Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*“, и омогући кандидаткињи јавну одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Београд,
19.04.2022. године

Проф. др Драгослава Радин, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Технолошка микробиологија

Проф. др Ивана Станковић, редовни професор,
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Фитопатологија

др Дубравка Биговић, виши научни сарадник,
Институт за проучавање лековитог биља „Др. Јосиф Панчић“ у Београду
Ужа научна дисциплина: Биљна биотехнологија

Проф. др Зорица Радуловић, редовни професор,
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Технолошка микробиологија

Проф. др Милена Пантић, ванредни професор,
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Технолошка микробиологија

Прилог

Објављен рад Иване Живковић, магист. инж., у научном часопису на SCI листи:

Živković, I., Šavikin, K., Živković, J., Zdunić, G., Janković, T., Lazić, D., Radin, D. (2021). Antiviral Effects of Pomegranate Peel Extracts on Human Norovirus in Food Models and Simulated Gastrointestinal Fluids. *Plant Foods for Human Nutrition* 76 (2), 203–209.

<https://doi.org/10.1007/s11130-021-00895-7>

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Датум: 19.04.2022. године

ОСЕНА ИЗВЕШТАЈА 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 „Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни антивирусни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*“, аутора Иване Живковић, маг. инж., констатујем да утврђено подударање текста износи 9 %. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата истраживања докторанда, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

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, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ментор

др Драгослава Радин, редовни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет