

ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ			
СЕКРЕТАРИЈАТ			
Примљено: 15. 10. 2021.			
Орг. јод.	Број	Прилог	Вредност
01	1740/3		

UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata mag. farm. Dušana Ušjaka

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 09.09.2021. godine, Odlukom broj 1740/2 imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata mag. farm. Dušana Ušjaka, pod naslovom:

„Uticaј novosintetisanih derivata halkona na rast, produkciju biofilma i faktore virulencije multirezistentnih sojeva *Acinetobacter baumannii*“

Komisija u sastavu:

1. Dr Dragana Božić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr Branka Ivković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr Magdalena Stevanović, naučni savetnik, Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti
4. Dr Miroslav Dinić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Mentor:

Dr Marina Milenković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

1. OSNOVNI PODACI O KANDIDATU I DISERTACIJI

A. Osnovni podaci o kandidatu. Dušan Ušjak, rođen 19.10.1991. u Pančevu, osnovnu i srednju školu završio je u Kovačici, a školske 2010/2011. god. upisao je integrisane akademske studije – studijski program Farmacija, na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Diplomirao je u februaru 2016. god. sa prosečnom ocenom 8,94, a iste godine položio je i državni ispit, nakon čega je kratko bio zaposlen kao diplomirani farmaceut u apoteci. Školske 2017/2018 god. upisao je doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, iz oblasti Farmaceutske mikrobiologije.

B. Naslov disertacije.

„Uticaj novosintetisanih derivata halkona na rast, produkciju biofilma i faktore virulencije multirezistentnih sojeva *Acinetobacter baumannii*“

C. Obim disertacije.

Disertacija je napisana na 187 strana i sadrži 8 poglavlja: uvod, cilj rada, materijali i metode, rezultati, diskusija, zaključci, literatura i prilozi.

D. Bibliografski podaci.

- **M21:** Filipović N, **Ušjak D**, Milenković MT, Zheng K, Liverani L, Boccaccini AR, Stevanović MM. (2021) Comparative study of the antimicrobial activity of selenium nanoparticles with different surface chemistry and structure. *Front Bioeng Biotechnol.* 8, 1591.
- **M22:** **Ušjak D**, Ivković B, Božić DD, Bošković L, Milenković M. (2019) Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb pathog.* 131, 186-96.
- **M22:** **Ušjak D**, Dinić M, Novović K, Ivković B, Filipović N, Stevanović M, Milenković MT. (2020) Methoxy-Substituted Hydroxychalcone Reduces Biofilm Production, Adhesion and Surface Motility of *Acinetobacter baumannii* by Inhibiting *ompA* Gene Expression. *Chem Biodivers.* 17, e2000786.
- **M23:** Stojanović D, Marčetić M, **Ušjak D**, Milenković M. (2020) Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia fruticosa* and *Salvia ringens* (lamiaceae). *Vojnosanit Pregl.* 00, 83-83.
- **M34:** **Ušjak D**, Ivković B, Božić D, Bošković L, Milenković M. „Novel chalcones – antimicrobial activity against multiresistant hospital strains of *Acinetobacter baumannii*“, 4th Institut Pasteur International Network Symposium, Paris, Novembar 2018.
- **M34:** **Ušjak D**, Ivković B, Bošković L, Božić D, Milenković M. „Chalcones as potential inhibitors of polymicrobial biofilm produced by MDR *Acinetobacter baumannii* wound isolates“, 12th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, Frankfurt, Septembar 2019.
- **M34:** **Ušjak D**, Dinić M, Novović K, Ivković B, Filipović N, Stevanović M, Milenković MT. “Synthetic 2-methoxy-2'-hydroxychalcone inhibits *ompA* gene expression in

2. PREDMET I CILJ DISERTACIJE

Predmet disertacije mag. farm. Dušana Ušjaka bio je određivanje profila rezistencije i kvantifikacija produkcije biofilma kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii*, kao i ispitivanje potencijalnih inhibitornih aktivnosti nosivih derivata halkona na rast, produkciju biofilma i ekspresiju faktora virulencije tih izolata. Glavni cilj disertacije bio je identifikacija derivata koji najpotentnije inhibira rast, produkciju i virulenciju testiranih sojeva, i kao takav predstavlja potencijalni antimikrobni ili antivirulentni agens. Specifični ciljevi bili su: genetička karakterizacija najrezistentnijih izolata; ispitivanje i potvrđivanje doprinosa produkcije biofilma perzistenciji izolata u spoljašnjoj sredini; sinteza i karakterizacija derivata halkona; identifikacija funkcionalnih grupa halkona koje najviše doprinose antimikrobnoj aktivnosti, samih i u kombinaciji sa antibioticima; i ispitivanje antibiofilmske aktivnosti halkona, uz predikciju mehanizama uključenih u navedenu aktivnost, kao i istovremeno pokazivanje antivirulentne aktivnosti kroz genotipsku i fenotipsku ekspresiju faktora virulencije povezanih sa produkcijom biofilma kod *A. baumannii*. Originalnost predmeta i ciljeva ove disertacije ogleda se u činjenici da uticaj halkona na virulenciju *A. baumannii* do sada nije ispitivan. Disertacija takođe obuhvata genetičku karakterizaciju panrezistentnih izolata, uz predikciju mehanizama rezistencije na kolistin. Karbapenem-rezistentni *A. baumannii*, koji čini preko 97% izolata obuhvaćenih u disertaciji, usled sposobnosti izuzetno brzog sticanja rezistencije na antibiotike, uz sve manje dostupnih kliničkih opcija, određen je od strane WHO kao patogen primarnog prioriteta za razvoj novih terapijskih alternativa, u čemu se ogleda značaj istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije.

3. OSNOVNE HIPOTEZE

Istraživanja sprovedena u okviru disertacije bila su zasnovana na sledećim hipotezama:

- Visok procenat ekstenzivno-rezistentnih, karbapenem-rezistentnih (>90%) sojeva *A. baumannii*, kao i određen broj panrezistentnih sojeva *A. baumannii*, prisutan je u bolnicama na teritoriji Beograda. Hipoteza je potvrđena.
- Mehanizmi rezistencije panrezistentnih sojeva *A. baumannii* na kolistin se uglavnom zasnivaju na povećanoj ekspresiji lipooligosaharid-modifikujućeg, dvokomponentni sistem PmrAB-kodirajućeg *pmrCAB* operona. Hipoteza je oborena.
- Klinički izolati *A. baumannii* imaju sposobnost kontaminacije konvencionalnih preparata antiseptika koji se koriste u tretmanu rana. Hipoteza je potvrđena.
- Produkcija biofilma značajno doprinosi perzistenciji sojeva *A. baumannii* u prisustvu dezinfekcionih sredstava. Hipoteza je oborena.
- Klinički izolati *A. baumannii* proizvode velike količine biofilma u širokom opsegu različitih uslova inkubacije. Hipoteza je potvrđena.
- Halkoni ispoljavaju umereno-jaku antimikrobnu aktivnost protiv *A. baumannii*. Hipoteza je potvrđena.

- Halkoni ispoljavaju sinergističke interakcije sa određenim antibioticima u inhibiciji rasta *A. baumannii*. Jedan od potencijalnih mehanizama je inhibicija efluksnih pumpi. Hipoteza je potvrđena.
- Halkoni ispoljavaju antibiofilmsku aktivnost protiv izolata *A. baumannii*. Hipoteza je potvrđena.
- Halkoni inhibiraju produkciju biofilma posredstvom uticaja na ekspresiju biofilm-zavisnih gena koji kodiraju faktore virulencije, i kao takvi predstavljaju potencijalne antivirulentne agense protiv *A. baumannii*. Hipoteza je potvrđena.

4. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mag. farm. Dušana Ušjaka pod nazivom „**Uticaj novosintetisanih derivata halkona na rast, produkciju biofilma i faktore virulencije multirezistentnih sojeva *Acinetobacter baumannii***“ sadrži ukupno 34 slika (7 u uvodu, 1 u materijalima i metodama i 26 u rezultatima), 18 tabela (7 u materijalima i metodama i 11 u rezultatima) i 715 literaturnih navoda.

U **uvodu** kandidat je na osnovu postojećih saznanja najsavremenijih istraživanja jasno i koncizno predstavio mehanizme perzistencije i rezistencije bakterijske vrste *Acinetobacter baumannii*, kao i faktore virulencije uključene u patogenezu infekcije. Posle kratkog istorijata taksonomske klasifikacije *A. baumannii*, sledi opis doprinosa tolerancije na isušivanje i proizvodnje biofilma perzistenciji *A. baumannii* na različitim površinama u bolničkom okruženju. Kandidat je zatim detaljno predstavio mehanizme rezistencije koje poseduje ova bakterijska vrsta, a nakon toga je koncizno opisao i savremenu epidemiološku sliku i kliničke manifestacije infekcije. Sledi detaljan opis doprinosa urođenog imunskog odgovora i svih dobro okarakterisanih faktora virulencije *A. baumannii* patogenezi infekcije, kao i pregled trenutno dostupnih terapijskih opcija. Na kraju uvoda navedeni su halkoni kao potencijalni novi terapijski agensi, njihove poznate biološke i farmakološke aktivnosti, kao i pretpostavljeni mehanizmi antimikrobnog i antivirulentnog delovanja.

Cilj rada je jasno definisan i predstavlja identifikaciju najaktivnijeg sintetisanog derivata halkona kroz evaluaciju uticaja na rast, produkciju biofilma i ekspresiju faktora virulencije multirezistentnih sojeva *A. baumannii*. Pored glavnog cilja postavljeno je 5 specifičnih ciljeva koji se odnose na: određivanje profila rezistencije kliničkih izolata *A. baumannii*; određivanje nivoa produkcije biofilma; sintezu i karakterizaciju sintetisanih halkona; određivanje antimikrobnih aktivnosti sintetisanih halkona; i određivanje antibiofilmskih i antivirulentnih aktivnosti sintetisanih halkona. Glavni cilj i specifični ciljevi su dobro postavljene.

U poglavlju **materijali i metode** detaljno je opisana primenjena metodologija. Poglavlje je organizovano u 9 potpoglavlja, od kojih se potpoglavlja 1-7 odnose na prvu fazu istraživanja (karakterizacija kliničkih izolata *A. baumannii* i sinteza i karakterizacija halkona), potpoglavlje 8 se odnosi na drugu fazu istraživanja (ispitivanje antimikrobnih i antivirulentnih aktivnosti halkona), dok je u potpoglavlju 9 opisana metodologija statističke analize rezultata.

U prva dva potpoglavlja opisana je procedura izolacije i identifikacije kliničkih izolata *A. baumannii*. Izolati su prikupljeni iz pet različitih zdravstvenih ustanova koje se nalaze na

teritoriji Beograda, a identifikacija na nivou vrste sprovedena je primenom analiza mikroskopskih, kulturelnih i biohemijskih osobina, i infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR). Treće potpoglavlje sadrži metode primenjene za ispitivanje antimikrobne osetljivosti i određivanje profila rezistencije izolata (VITEK 2, agar-difuziona metoda i bujon-mikrodiluciona metoda), dok je u četvrtom potpoglavlju opisana metodologija genetičke karakterizacije kolistin-rezistentnih izolata (gel-elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE), *Real-Time* kvantitativna lančana reakcija polimeraze (RT-qPCR), sekvenciranje celog genoma (WGS), multilokusno tipiziranje sekvence (MLST), identifikacija aminokiselinskih supstitucija komparativnom analizom genoma i analiza pan-genoma). U petom potpoglavlju navedene su metode primenjene za ispitivanje otpornosti izolata iz rana na baktericidno dejstvo antiseptika i topikalnih antibiotika (*Time-kill test*) i doprinosa produkcije biofilma perzistenciji izolata u prisustvu ovih agenasa. Način kvantifikacije nivoa produkcije biofilma od strane izolata pri različitim uslovima kultivacije je dalje opisan u šestom potpoglavlju, a za određivanje nivoa produkcije biofilma primenjena je *in vitro* statička metoda sa polistirenskim mikrotitarskim pločama sa 96 mesta uz kolorimetrijsku kvantifikaciju safraninom obojenog biofilma. Sedmo potpoglavlje odnosi se na opis sinteze (bazno-katalizovana *Claisen-Schmidt* kondenzacija) i karakterizacije (FTIR, nuklearna magnetna rezonanca (NMR), elektrosprej jonizaciona masena spektrometrija (ESI-MS), svetlosna mikroskopija, rendgenska difrakciona analiza (XRD), termogravimetrijska i diferencijalna termalna analiza (TGA-DTA) i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)) ukupno četiri različito supstituisana derivata hidrosihalkona.

U osmom potpoglavlju opisan je način ispitivanja antimikrobne aktivnosti halkona, samih (bujon-mikrodiluciona metoda) ili u kombinaciji sa antibioticima (*Checkerboard* metoda), i način određivanja vremenski-zavisnog baktericidnog dejstva halkona (*Time-kill test*), a takođe i metodologija određivanja antibiofilmskih i antivirulentnih osobina halkona. Pored uticaja na produkciju monomikrobnog biofilma *in vitro* statičkom metodom, navedena je i metodologija za ispitivanje uticaja na produkciju polimikrobnog biofilma *A. baumannii* izolata iz rana, u kombinaciji sa izolatima drugih vrsta mikroorganizama koje često uzrokuju ko-kontaminaciju rana (*Staphylococcus aureus*, *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*), kao i metodologija za ispitivanje uticaja na vijabilnost biofilmskih ćelija primenom 2,3,5-trifenil tetrazolijum hlorida (TTC), osetljivosti halkonima pretretiranih biofilmskih ćelija na antibiotik meropenem, i uticaja na produkciju monomikrobnog biofilma na poliuretanskim kateterima. Antivirulentne osobine halkona ispitane su primenom metoda za određivanje uticaja na motilitet (površinski i trzajući) i genotipsku ekspresiju biofilm-zavisnih faktora virulencije (RT-qPCR) i povezanih fenotipskih virulentnih osobina (adhezija za fibronektin i kolagen, i kolorimetrijska kvantifikacija produkcije autoinduktorskih molekula kvorum-sensing (QS) sistema acil-homoserin laktona (AHL)) izolata *A. baumannii*.

Rezultati su predstavljeni tekstualno, grafički i tabelarno na 46 strana i sadrže 26 slika i 11 tabela. Poglavlje je organizovano u 12 potpoglavlja, pri čemu su u potpoglavljima 1-7 prikazani rezultati prve faze istraživanja, dok potpoglavlja 8-12 sadrže rezultate druge faze istraživanja. Rezultati su napisani na jasan, sistematičan i koncizan način.

Diskusija sadrži analizu rezultata eksperimentalnog rada na osnovu poređenja sa rezultatima iz dostupne literature. Poglavlje je sačinjeno od nekoliko celina: sistematičan pregled tehnika koje se koriste u identifikaciji vrste *A. baumannii*; epidemiološka slika i genotipizacija sojeva *A. baumannii* izolovanih na teritoriji Republike Srbije; osetljivost *A. baumannii* na dezinfekciona sredstva koja se koriste u bolnicama; uticaj genotipa i fenotipa, hranljivih medijuma i temperatura primenjenih tokom kultivacije i uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma *A. baumannii*; pregled dostupnih metoda sinteze halkona; antimikrobne aktivnosti jedinjenja sa halkonskom ili srodnom strukturom; i antivirulentne aktivnosti jedinjenja sa halkonskom ili srodnom strukturom.

U poglavlju **zaključci** na koncizan način navedeno je 16 najvažnijih zaključaka proisteklih iz analize rezultata eksperimentalnog rada, koji su u skladu sa postavljenim glavnim i specifičnim ciljevima rada.

Poglavlje **literatura** sadrži spisak literaturnih navoda (715) citiranih harvardskim stilom.

U **prilozima** nalaze se grafički prikazi NMR karakterizacije sintetisanih halkona.

5. OSTVARENI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS DOKTORSKE DISERTACIJE

Ostvareni rezultati ove doktorske disertacije predstavljeni su u dve celine.

Prva celina prikazuje rezultate karakterizacije kliničkih izolata *A. baumannii* (**prva faza** istraživanja). Pokazano je da je ukupno 43 klinička izolata odgovaralo kriterijumu identifikacije za vrstu *A. baumannii*. Izolati su ispoljili izrazito visok nivo rezistencije na antibiotike sa ekstenzivno rezistentnim (XDR) ili panrezistentnim (PDR) fenotipom u >95% slučajeva. Svega jedan izolat pokazao se osetljivim na karbapeneme, dok je ukupno 8 izolata ispoljilo rezistenciju na kolistin. Genotipizacijom je pokazano da su kolistin-rezistentni izolati pripadali ST2 (7 izolata) ili ST492 (1 izolata) tipu sekvence (IC II klonaska linija). Analizom genske ekspresije i sekvenciranjem genoma ovih izolata otkriveni su potencijalni mehanizmi rezistencije na kolistin (redukcija ekspresije *lpxACD* gena, i prisustvo aminokiselinskih mutacija u okviru PmrC fosfoetanolamin transferaze ili PmrB senzor kinaze) i omogućena je analiza rezistoma i pan-genoma, kojima je potvrđen visok stepen srodnosti, kao i PDR fenotip kod 7 izolata. Izolati su takođe pokazali sposobnost kontaminacije fiziološkog rastvora i rastvora antiseptika koji se primenjuju za tretman rana, pošto su u visokom procentu preživeli inkubaciju tokom 2 ili 24 h, uz tendenciju rasta u određenim slučajevima. Doprinos produkcije biofilma perzistenciji u okviru ovih rastvora, međutim, nije pokazan. Ispitivanja produkcije biofilma pokazala su da svi izolati osim jednog mogu da se klasifikuju kao proizvođači biofilma, i to u najvećem procentu kao izraziti proizvođači (*Strong biofilm producer*). Produkcija biofilma održala se na visokom nivou u širokom opsegu temperatura inkubacije (25-45 °C), dok je nutritivni sastav hranljivog medijuma značajno uticao na nivo produkcije, pri čemu je prisustvo glukoze stimulisalo, a prisustvo peptona inhibiralo produkciju. Takođe, kultivacija izolata u prisustvu subinhibitornih koncentracija meropenema i ciprofloksacina dovela je do inhibicije produkcije biofilma, dok prisustvo amikacina nije značajno uticalo na nivo produkcije. Na kraju prve celine navedeni su rezultati sinteze i karakterizacije 4 različito-supstituisana derivata 2'-hidroksihalkona, gde je pokazano da su halkoni visoko kristalne strukture i stabilni pri temperaturama do 200 °C.

Rezultati **druge faze** istraživanja prikazani su u okviru druge celine rezultata i odnose se na antimikrobne i antivirulentne aktivnosti sintetisanih halkona protiv kliničkih izolata *A. baumannii*. Pokazano je da halkoni poseduju umerenu antimikrobnu aktivnost protiv testiranih izolata (opseg MIK 75-225 µg/mL), pri čemu su najbolju aktivnost pokazali derivati sa metoksi funkcionalnim grupama. Takođe, halkoni su ispoljili sinergističku aktivnost sa meropenemom protiv određenog broja izolata, od čega je najjača sinergistička aktivnost zabeležena protiv soja čiji je primarni mehanizam rezistencije na karbapeneme povezan sa efluksnim pumpama (pokazano pomoću inhibitora efluksnih pumpi verapamila), na osnovu čega je kao pretpostavljeni mehanizam sinergističke aktivnosti navedena inhibicija efluksnih pumpi. Halkoni su pokazali i umerenu antibiofilmsku aktivnost protiv testiranih izolata, a dva halkona (halkon sa jednom metoksi grupom i halkon sa trifluorometil grupom) sa najpotentnijim aktivnostima odabrana su za dalja ispitivanja antibiofilmskih aktivnosti, gde je halkon sa jednom metoksi grupom pokazao najjaču aktivnost u inhibiciji produkcije polimikrobnog biofilma, u redukciji vijabilnosti biofilmskih ćelija, u redukciji MIK biofilmskih ćelija za meropenem i u inhibiciji produkcije biofilma na kateterima. Pored antibiofilmske aktivnosti, halkoni su ispoljili sposobnost izrazite inhibicije motiliteta *A. baumannii*, naročito halkon sa trifluorometil grupom, koji je u koncentraciji od 35 µg/mL u potpunosti blokirao površinski motilitet svih ispitanih sojeva. Konačno, antivirulentna aktivnost metoksi supstituisanog halkona (odabranog usled najpotentnijih antibiofilmskih aktivnosti) potvrđena je kroz inhibiciju genske ekspresije biofilm-zavisnog faktora virulencije *A. baumannii* OmpA. Testirani halkon je značajno inhibirao ekspresiju *ompA* u niskim koncentracijama (10-70 µg/mL) što je potvrđeno i kroz uticaj na fenotipsku ekspresiju faktora virulencije povezanih sa ekspresijom *ompA* (inhibicija adhezije za fibronektin i kolagen, a prethodno inhibicija produkcije biofilma i površinskog motiliteta). Osim toga, ovaj halkon je značajno inhibirao i ekspresiju *bap* i *abaI* gena, koji takođe kodiraju biofilm-zavisne faktore virulencije, i to visoko potentno pri vrlo niskoj koncentraciji (10 µg/mL). S druge strane, uticaj na *abaI* nije potvrđen kroz fenotipsku ekspresiju aktivnosti kvorum-sensing sistema.

Ovim rezultatima pokazano je da jedinjenja halkonske strukture mogu ispoljiti značajnu antivirulentnu aktivnost protiv *A. baumannii*. Istraživanja potencijalnih antimikrobnih agenasa prvenstveno obuhvataju ispitivanje uticaja na rast patogena, dok su slabo zastupljena ispitivanja antivirulentnih aktivnosti, iako to predstavlja jedan od alternativnih pristupa terapiji multirezistentnih infekcija koji se u poslednje vreme intenzivno istražuje, pošto pruža mogućnost minimalnog uticaja na prirodnu selekciju rezistentnih mutanata. U skladu sa navedenim, antivirulentna aktivnost halkona protiv *A. baumannii* do sada nije ispitivana, i sa tog gledišta najveći naučni doprinos ove disertacije upravo jeste to što je po prvi put pokazana mogućnost antivirulentne aktivnosti ove grupe jedinjenja protiv *A. baumannii*, a potencijalno i protiv drugih multirezistentnih patogena. Dodatno, metoksi supstituisan derivat 2'-hidroksihalkona identifikovan je kao najpotentniji antivirulentni agens, što može biti od značaja za buduća dizajniranja i sintezu novih halkonskih jedinjenja čije će se antivirulentne aktivnosti potencijalno ispitivati. Značajan naučni doprinos disertacije takođe obuhvata identifikaciju velikog procenta kolistin-rezistentnih izolata poreklom iz zdravstvenih ustanova Beograda, kao i predikciju redukcije ekspresije *lpxACD* gena kao najverovatnijeg i najčešćeg mehanizma rezistencije na kolistin.

6. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

U prvoj fazi istraživanja pokazano je da je većina ispitivanih sojeva *A. baumannii* bila rezistentna na karbapeneme (>97%), odnosno da su ispoljili ekstenzivno rezistentni fenotip. Izolati su u najvećem broju slučajeva poticali iz uzoraka donjeg respiratornog trakta, i iz inficiranih rana i hemokultura. Gotovo identična struktura porekla sojeva i osetljivosti na antibiotike zabeležena je i u prethodnim studijama sprovedenim na sojevima izolovanim iz bolnica na teritoriji Republike Srbije. Međutim, procenat rezistencije na kolistin zabeležen u okviru ove disertacije (>18%), znatno je veći u poređenju sa rezultatima prethodnih studija (2,1-4,3%) (Gajic *et al.*, 2020; Lukovic *et al.*, 2020). Genetičkom karakterizacijom kolistin-rezistentnih izolata pokazano je da se radi o srodnim sojevima koji pripadaju ST2 ili ST492 tipu sekvence i od stečenih karbapenemaza sadrže samo enzime OXA-23 grupe. Navedeni tipovi sekvence pripadaju globalno rasprostranjenom klonu IC II i njihovo prisustvo na teritoriji Srbije zabeleženo je u prethodnim studijama (Lukovic *et al.*, 2020; Kostyanov *et al.*, 2021). Prisustvo karbapenemaza OXA-23 grupe je ranije zabeleženo i vrlo rasprostranjeno među ovim klonskim lozama, a zanimljivo, genske determinante enzima OXA-40 grupe koji su takođe često prisutni, nisu detektovane u okviru ove disertacije (Lukovic *et al.*, 2020; Kostyanov *et al.*, 2021). Mehanističkim analizama utvrđeno je da je smanjena ekspresija lipooligosaharid-biosintetičkih gena *lpxACD* najverovatniji uzrok rezistencije na kolistin. Pored toga, kod ST492 izolata pronađene su supstitucije aminokiselina u okviru PmrB senzor kinaze, koje mogu da budu indikativne za rezistenciju, a takođe kod svih izolata detektovano je nekoliko nedefinisanih mutacija u okviru PmrC fosfoetanolamin transferaze, međutim u studijama genske ekspresije nije potvrđena stimulacija ekspresije *pmrCAB* gena kao posledica mutacija. Ovaj rezultat je u suprotnosti sa prethodno pokazanom hiperekspresijom *pmrCAB* gena kao najčešćim mehanizmom rezistencije *A. baumannii* na kolistin (Kyriakidis *et al.*, 2021). U daljem toku disertacije pokazano je da testirani izolati mogu perzistirati u okviru fiziološkog rastvora i rastvora antiseptika koji se primenjuju za tretman rana (3% borna kiselina i 0,1% etakridin laktat) tokom 24 h, a u manjoj meri i u okviru 1% rastvora klindamicina tokom 2 h. Mogućnost kontaminacije fiziološkog rastvora dobro je poznata i ranije zabeležena (Infante *et al.*, 2012), međutim, baktericidna aktivnost antiseptika koji se u bolničkim uslovima opsežno koriste za tretman dubokih rana do sada nije ispitivana, i rezultati ove disertacije ukazuju da kontaminacija ovih sredstava može biti jedan od uzroka *A. baumannii* bolničkih epidemija. U ranijim studijama pokazana je smanjena osetljivost epidemijskih sojeva *A. baumannii* na dezinfekciona sredstva koja se primenjuju na nežive površine ili intaktnu kožu. Takođe, pokazano je da ta sredstva gube baktericidnu aktivnost ako se primene u razblaženom obliku, a to u suštini jesu mnogi antiseptici koji se primenjuju na rane (Fernández-Cuenca *et al.*, 2015). Doprinos produkcije biofilma perzistenciji sojeva, međutim, nije potvrđen, iako se u postojećoj literaturi mogu pronaći podaci da produkcija biofilma može povećati otpornost prema dezinfekcionim sredstvima (Ivanković *et al.*, 2017). Dalje je pokazano da su izolati u proseku proizvodili velike količine biofilma i u najvećem broju slučajeva klasifikovani su kao izraziti proizvođači. Prethodno je pokazano da sojevi IC II klona (i pre svega ST2 tipa) prosečno proizvode najveće količine biofilma, uz pretpostavku da je to važna fenotipska osobina koja je omogućila široku rasprostranjenost ovih sojeva (Yang *et al.*, 2019). Ako se uzmu u obzir rezultati genotipizacije

kolistin-rezistentnih sojeva (u >85% slučajeva ST2 tipa), koji su izolovani u istom periodu na sličnim lokacijama kao i ostali testirani sojevi, može se zaključiti da su rezultati klasifikacije po tipovima proizvođača biofilma u skladu sa prethodnim nalazima. Takođe, visok nivo proizvodnje biofilma pokazan je i u drugoj studiji sprovedenoj na izolatima prikupljenim iz različitih bolnica u Srbiji (**Vukotic et al., 2020**). Nakon toga, testiran je uticaj različitih uslova inkubacije na nivo proizvodnje biofilma i pokazano da je produkcija najjača na sobnoj temperaturi i u prisustvu glukozom obogaćenih hranljivih medijuma. Nivo produkcije biofilma bio je visok čak i na 45 °C, a produkcija je najviše bila inhibirana u prisustvu peptonima bogatih i nutritivno siromašnih hranljivih medijuma. Veći nivo produkcije biofilma od strane *A. baumannii* na sobnoj temperaturi najverovatnije je posledica hiperekspresije *csu* operona, koji kodira pile koji učestvuju u adheziji za abiotičke površine (prva faza u produkciji biofilma) (**De Silva et al., 2018**). Podaci o stimulatornom dejstvu glukoze i inhibitornom dejstvu peptona takođe se mogu pronaći u postojećoj literaturi (**Nucleo et al., 2009**; **Gentile et al., 2014**). Produkcija biofilma *A. baumannii* na 45 °C do sada nije ispitivana, iako je poznato da *A. baumannii* spada među retke *Acinetobacter* vrste koje mogu u 100% slučajeva perzistirati na ovoj temperaturi (**Bouvet i Grimont, 1987**), a na osnovu rezultata dobijenih u ovoj disertaciji može se pretpostaviti da proizvodnja biofilma ima važnu ulogu u tome. Na kraju određivan je uticaj subinhibitornih koncentracija određenih antibiotika na produkciju biofilma, kako je poznato da antibiotici u ovim koncentracijama mogu ili stimulisati ili inhibirati produkciju (**Davies et al., 2006**). Pokazano je da meropenem i ciprofloksacin u proseku inhibiraju produkciju biofilma, dok amikacin nema značajan uticaj, ali je dejstvo soj-specifično, pošto je kod manjeg broja sojeva uočena i stimulacija produkcije. Slični rezultati kada su u pitanju karbapenemi prethodno su objavljeni (**Navidifar et al., 2019**), dok uticaj ciprofloksacina na produkciju biofilma *A. baumannii* do sada nije ispitivan, ali je njegova antibiofilmska aktivnost pokazana na nekim drugim vrstama (**Szczuka et al., 2017**). U poslednjem delu prve faze istraživanja koje se odnosilo na sintezu i karakterizaciju derivata 2'-hidroksihalkona, pokazano je da su bazno-katalizovanom *Claisen-Schmidt* kondenzacijom sintetisani halkoni generalno u visokom prinosu, i da su jedinjenja ispoljila visoku kristaliničnost i termalnu stabilnost do 200-270 °C (pri tome jedinjenja sa metoksi grupama ispoljila su veću stabilnost), što je u skladu sa ranijim rezultatima (**Zhuang et al., 2017**; **Kobelnik et al., 2018**).

U drugoj fazi istraživanja pokazano je da sintetisani halkoni ispoljavaju umerenu antimikrobnu aktivnost protiv testiranih izolata *A. baumannii*, što je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su ispitivali različito supstituisana halkonska jedinjenja (**Zhang et al., 2018**; **Ajiboye et al., 2019**). Osim toga, poznato je da prisustvo metoksi grupa kod halkonskih jedinjenja može potencirati antimikrobnu aktivnost, što je i u ovom istraživanju pokazano, s obzirom da su prosečno najpotentniju aktivnost ispoljili halkoni sa ovim funkcionalnim grupama (**Dan i Dai, 2020**). Nakon toga, pokazano je da sintetisani halkoni deluju sinergistički sa meropenemom protiv određenog broja izolata, a zabeleženo je i nekoliko parcijalnih sinergističkih interakcija sa amikacinom i ciprofloksacinom. U postojećoj literaturi ne mogu se pronaći rezultati ispitivanja interakcija između halkona i antibiotika protiv *A. baumannii*, ali je zato utvrđeno postojanje potentnih sinergističkih aktivnosti halkona sa različitim antibioticima protiv drugih vrsta, posebno protiv *S. aureus* (**Tran et al., 2012**; **Božić et al., 2014**). U prilog tome, mehanističkim studijama utvrđena je inhibicija efluksnih pumpi kao pretpostavljeni mehanizam

sinergističke aktivnosti halkona (**Tran et al., 2012**). Vodeći se tim tvrdnjama, komparativnom analizom rezultata sinergističkih aktivnosti halkona, odnosno verapamila (inhibitor efluksnih pumpi) kao poznatog standarda, sa meropenemom protiv istih izolata *A. baumannii*, pokazano je da je i u ovom slučaju inhibicija efluksnih pumpi bila najverovatniji mehanizam aktivnosti. Dalje je testiran uticaj sintetisanih halkona na produkciju biofilma izolata *A. baumannii* i pokazano da halkoni umereno inhibiraju produkciju biofilma primenjeni u subinhibitornim koncentracijama. Najpotentnije su delovali derivati sa jednom metoksi grupom, odnosno jednom trifluorometil grupom, koji su selektirani za dalja testiranja antibiofilmskih svojstava. Antibiofilmska aktivnost halkona od ranije je poznata (**Farhadi et al., 2019**), međutim nije do sada ispitivana protiv vrste *A. baumannii*. Selektirani halkoni su pokazali značajnu aktivnost i u inhibiciji polimikrobnog biofilma *A. baumannii* sa *S. aureus*, odnosno *C. albicans*, u redukciji vijabilnosti biofilmskih ćelija monomikrobnih i polimikrobnih zajednica, kao i u redukciji MIK biofilmskih ćelija za meropenem i inhibiciji produkcije biofilma na kateterima (posebno izolata iz urinokulture). Od toga potentnije je delovao halkon sa metoksi grupom, a halkon sa trifluorometil grupom je nešto bolje rezultate dao jedino kada je inhibicija polimikrobnog biofilma *A. baumannii* + *C. albicans* u pitanju. Navedeni tipovi antibiofilmskih aktivnosti halkona po prvi put su ispitani u okviru ove disertacije, a demonstracijom da halkoni značajno inhibiraju produkciju polimikrobnog biofilma koji se uobičajeno prave na dubokim ranama i ometaju zarastanje, i da mogu značajno redukovati MIK biofilmskih ćelija za meropenem, izveden je zaključak da bi kombinacija halkona (posebno metoksi supstituisanog) i meropenema mogla biti efikasna u tzv. BBWC (*Biofilm-Based Wound Care*) novom pristupu tretmana inficiranih rana. Ovaj pristup pored primene antibiotika širokog spektra dejstva uključuje i pažljiv debridman rana i primenu lokalnog antibiofilmskog agensa (**Wu et al., 2019**). Dodatno je ispitana i aktivnost dva selektirana halkona u inhibiciji motiliteta, jednog od potencijalnih faktora virulencije *A. baumannii*, i pokazano je da suplementacija hranljivih medijuma halkonima izrazito inhibira motilitet, posebno u slučaju trifluorometil supstituisanog derivata koji je čak i u nižoj testiranoj koncentraciji kompletno blokirao površinski motilitet svih testiranih sojeva. Uticaj halkona na pokretljivost bakterija do sada nije ispitivan, za razliku od srodnih flavonoidnih jedinjenja, od kojih su neki pored potentne inhibicije motiliteta *A. baumannii* ispoljili i značajnu antivirulentnu aktivnost na *in vivo* modelima *A. baumannii* infekcije (**Bhargava et al., 2015; Raorane et al., 2019**). Konačno, pokazano je da metoksi supstituisani derivat 2'-hidroksihalkona, odabran na osnovu najpotentnijih antibiofilmskih osobina, ispoljava jaku antivirulentnu aktivnost protiv *A. baumannii*, u niskim koncentracijama, posredstvom inhibicije genotipske i fenotipske ekspresije biofilm-zavisnih faktora virulencije OmpA i Bap. Posebno se značajnim rezultatom može smatrati uticaj na ekspresiju OmpA, čija je uloga u virulenciji dokazana u kliničkim studijama, gde je ekspresija *ompA* identifikovana kao nezavisan faktor rizika za razvoj pneumonije, bakterijemije, kao i za smrtni ishod kod ispitivanih pacijenata (**Sánchez-Encinales et al., 2017**). Pored toga, u *in vivo* studijama pokazano je da sintetički agensi koji inhibiraju OmpA mogu značajno smanjiti broj bakterijskih kolonija u krvi, slezini i plućima, kao i smrtnost inficiranih miševa (**Vila-Farrés et al., 2017**). Sposobnost inhibicije ekspresije *ompA* nedavno je pokazana kod flavonoidnog jedinjenja mirtenola, sličnog po strukturi halkonima (**Selvaraj et al., 2020**).

Citirana literatura

1. Ajiboye, T. O., Aliyu, N. O. i Ajala-Lawal, R. A. (2019). Lophirones B and C induce oxidative cellular death pathway in *Acinetobacter baumannii* by inhibiting DNA gyrase. *Microbial pathogenesis*, *130*, 226-231.
2. Bhargava, N., Singh, S. P., Sharma, A., Sharma, P. i Capalash, N. (2015). Attenuation of quorum sensing-mediated virulence of *Acinetobacter baumannii* by *Glycyrrhiza glabra* flavonoids. *Future microbiology*, *10*, 1953-1968.
3. Bouvet, P. J. M. i Grimont, P. A. D. (1987). Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* *138*, 569-578.
4. Božić, D. D., Milenković, M., Ivković, B. i Cirković, I. (2014). Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Indian journal of medical research*, *140*, 130.
5. Dan, W. i Dai, J. (2020). Recent developments of chalcones as potential antibacterial agents in medicinal chemistry. *European journal of medicinal chemistry*, *187*, 111980.
6. Davies, J., Spiegelman, G. B. i Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current opinion in microbiology*, *9*, 445-453.
7. De Silva, P. M., Chong, P., Fernando, D. M., Westmacott, G. i Kumar, A. (2018). Effect of incubation temperature on antibiotic resistance and virulence factors of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *62*, e01514-17.
8. Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M. i Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, *33*, 13-40.
9. Fernández-Cuenca, F., Tomás, M., Caballero-Moyano, F. J., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Pachón, J., Cisneros, J. M., Rodríguez-Baño, J. i Pascual, Á. (2015). Reduced susceptibility to biocides in *Acinetobacter baumannii*: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*, 3222-3229.
10. Gajic, I., Ranin, L., Kekic, D., Opavski, N., Smitran, A., Mijac, V., Jovanovic, S., Hadnadjev, M., Travar, M. i Mijovic, G. (2020). Tigecycline susceptibility of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from intensive care units in the western Balkans. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 1-6.
11. Gentile, V., Frangipani, E., Bonchi, C., Minandri, F., Runci, F. i Visca, P. (2014). Iron and *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Pathogens*, *3*, 704-719.
12. Infante, V. V., Cano, A. M., Valdovinos, H. M., Macías, A. E. i Álvarez, J. A. (2012). Solución salina como medio de cultivo desde el punto de vista de las bacteriemias nosocomiales. *Revista de Investigación Clínica*, *64*, 120-125.
13. Ivanković, T., Goić-Barišić, I. i Hrenović, J. (2017). Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter baumannii* biofilms on glass and ceramic. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, *68*, 99-107.

14. Kobelnik, M., Ferreira, L. M. B., Regasini, L. O., Dutra, L. A., da Silva Bolzani, V. i Ribeiro, C. A. (2018). Thermal study of chalcones. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *132*, 425-431.
15. Kostyanev, T., Xavier, B. B., García-Castillo, M., Lammens, C., Acosta, J. B. F., Rodríguez-Baño, J., Cantón, R., Glupczynski, Y. i Goossens, H. (2021). Phenotypic and molecular characterizations of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected within the EURECA study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *106345*.
16. Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*, *10*, 373.
17. Lukovic, B., Gajic, I., Dimkic, I., Kekic, D., Zornic, S., Pozder, T., Radisavljevic, S., Opavski, N., Kojic, M. i Ranin, L. (2020). The first nationwide multicenter study of *Acinetobacter baumannii* recovered in Serbia: emergence of OXA-72, OXA-23 and NDM-1-producing isolates. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *9*, 1-12.
18. Navidifar, T., Amin, M. i Rashno, M. (2019). Effects of sub-inhibitory concentrations of meropenem and tigecycline on the expression of genes regulating pili, efflux pumps and virulence factors involved in biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Infection and drug resistance*, *12*, 1099.
19. Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G., Migliavacca, R., Giacobone, E., Navarra, A., Pagani, L. i Landini, P. (2009). Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *BMC microbiology*, *9*, 1-14.
20. Raorane, C. J., Lee, J. H., Kim, Y. G., Rajasekharan, S. K., García-Contreras, R. i Lee, J. (2019). Antibiofilm and antivirulence efficacies of flavonoids and curcumin against *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, *10*, 990.
21. Sánchez-Encinales, V., Álvarez-Marín, R., Pachón-Ibáñez, M. E., Fernández-Cuenca, F., Pascual, A., Garnacho-Montero, J., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Tomás, M. M., Cisneros, J. M., Bou, G., Rodríguez-Baño, J., Pachón, J. i Smani, Y. (2017). Overproduction of outer membrane protein A by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. *The Journal of infectious diseases*, *215*, 966-974.
22. Selvaraj, A., Valliammai, A., Sivasankar, C., Suba, M., Sakthivel, G. i Pandian, S. K. (2020). Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*, *10*, 1-14.
23. Szczuka, E., Jabłońska, L. i Kaznowski, A. (2017). Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, *163*, 712.
24. Tran, T. D., Do, T. H., Tran, N. C., Ngo, T. D., Tran, C. D. i Thai, K. M. (2012). Synthesis and anti Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity of substituted chalcones alone and in combination with non-beta-lactam antibiotics. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *22*, 4555-4560.
25. Vila-Farrés, X., Parra-Millán, R., Sánchez-Encinales, V., Varese, M., Ayerbe-Algaba, R., Bayó, N., Guardiola, S., Pachón-Ibáñez, M. E., Kotev, M., García, J., Teixidó, M., Vila, J.,

- Pachón, J., Giralt, E. i Smani, Y. (2017). Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Scientific reports*, 7, 1-11.
26. Vukotic, G., Obradovic, M., Novovic, K., Di Luca, M., Jovicic, B., Fira, D., Neve, H., Kojic, M. i McAuliffe, O. (2020). Characterization, antibiofilm, and depolymerizing activity of two phages active on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in medicine*, 7, 426.
27. Wu, Y. K., Cheng, N. C. i Cheng, C. M. (2019). Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis. *Trends in biotechnology*, 37, 505-517.
28. Yang, C. H., Su, P. W., Moi, S. H. i Chuang, L. Y. (2019). Biofilm formation in *Acinetobacter Baumannii*: genotype-phenotype correlation. *Molecules*, 24, 1849.
29. Zhang, M., Prior, A. M., Maddox, M. M., Shen, W. J., Hevener, K. E., Bruhn, D. F., Lee, R. B., Singh, A. P., Reinicke, J., Simmons, C. J., Hurdle, J. G., Lee, R. E. i Sun, D. (2018). Pharmacophore modeling, synthesis, and antibacterial evaluation of chalcones and derivatives. *ACS omega*, 3, 18343-18360.
30. Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C. i Miao, Z. (2017). Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical reviews*, 117, 7762-7810.

7. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Naučni radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

Ušjak D, Ivković B, Božić DD, Bošković L, Milenković M. (2019) Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb pathog.* 131, 186-96.

Ušjak D, Dinić M, Novović K, Ivković B, Filipović N, Stevanović M, Milenković MT. (2020) Methoxy-Substituted Hydroxychalcone Reduces Biofilm Production, Adhesion and Surface Motility of *Acinetobacter baumannii* by Inhibiting *ompA* Gene Expression. *Chem Biodivers.* 17, e2000786.

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34)

Ušjak D, Ivković B, Božić D, Bošković L, Milenković M. „Novel chalcones – antimicrobial activity against multiresistant hospital strains of *Acinetobacter baumannii*“, 4th Institut Pasteur International Network Symposium, Paris, Novembar 2018.

Ušjak D, Ivković B, Bošković L, Božić D, Milenković M. „Chalcones as potential inhibitors of polymicrobial biofilm produced by MDR *Acinetobacter baumannii* wound isolates“, 12th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, Frankfurt, Septembar 2019.

Ušjak D, Dinić M, Novović K, Ivković B, Filipović N, Stevanović M, Milenković MT. “Synthetic 2-methoxy-2'-hydroxychalcone inhibits *ompA* gene expression in *Acinetobacter baumannii* hospital strains”, FEMS Online Conference on Microbiology, Oktobar, 2020

8. ZAKLJUČAK SA OBRAZLOŽENJEM NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezistencija *A. baumannii* sojeva na klinički dostupne antibiotike svake godine je sve veća i sve su češći slučajevi nedostatka efikasne terapije za inficirane pacijente. U okviru ove disertacije, poređenjem sa rezultatima prethodnih studija, pokazan je značajan porast zastupljenosti panrezistentnih sojeva u zdravstvenim ustanovama na prostoru Beograda. Pokazano je da veliki broj sojeva, smanjenom ekspresijom lipooligosaharida, može da stekne rezistenciju na kolistin, koji je u mnogim slučajevima lek poslednjeg izbora u terapiji teških infekcija.

Od 2017. godine, *A. baumannii* se nalazi na SZO listi pretećih patogena od kritične važnosti za razvoj novih terapijskih mogućnosti, a s obzirom da je tokom prethodnih godina ovaj patogen pokazao sposobnost izrazito brzog sticanja rezistencije na antibiotike, razmatraju se i različiti, alternativni terapijski pristupi. Targetiranje virulencije je jedan od alternativnih pristupa, koji se zasniva na inhibiciji faktora virulencije bez istovremenog uticaja na rast patogena, sa ciljem prevencije razvoja teškog kliničkog oblika infekcije, uz znatno usporenu prirodnu selekciju rezistentnih mutanata. Halkoni su jedinjenja čija su antimikrobna svojstva od ranije poznata. Međutim, iako je kod nekih srodnih flavonoidnih jedinjenja prethodno pokazano potentno antivirulentno dejstvo protiv *A. baumannii*, uticaj halkona na faktore virulencije ovu bakteriju do sada nije ispitivan. U ovoj disertaciji po prvi put je pokazano da halkoni poseduju sposobnost značajne inhibicije ključnih faktora virulencije *A. baumannii*, i da to mogu ostvariti u relativno niskim koncentracijama. S obzirom da je u istraživanjima obuhvaćen mali broj jedinjenja, prikazani rezultati pružaju dobru osnovu za brojne buduće eksperimente koji bi mogli da se sprovode u cilju identifikacije derivata halkona sa najpovoljnijim odnosom antivirulentnih aktivnosti i neželjenih dejstava, kao adekvatnih kandidata za *in vivo* ispitivanja.

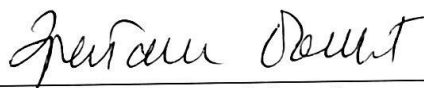
MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu pregleda doktorske disertacije mag. farm. Dušana Ušjaka, pod nazivom „**Uticaj novosintetisanih derivata halkona na rast, produkciju biofilma i faktore virulencije multirezistentnih sojeva *Acinetobacter baumannii***“, može se zaključiti da je kandidat ispunio postavljene ciljeve i da rezultati prikazani u disertaciji predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos, što je potvrđeno njihovim objavljivanjem u obliku dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima.

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan Izveštaj i nakon dobijanja saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu odobri mag. farm. Dušanu Ušjaku javnu odbranu doktorske disertacije.

Beograd, 07.10.2021. god.

Članovi Komisije:



Dr Dragana Božić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet



Dr Branka Ivković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet



Dr Magdalena Stevanović, naučni savetnik,
Institut tehničkih nauka Srpske akademije
nauka i umetnosti



Dr Miroslav Dinić, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za
molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo