

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 09.06.2016. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Uticaj oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na imunološke i metaboličke parametre miševa u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre**“, kandidata dipl.farm. Nevene Ivanović, u sledećem sastavu:

1. Dr sc. Brižita Đorđević - mentor rada, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Rajna Minić – naučni saradnik, Odsek za naučno istraživački rad, Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak
3. Dr sc. Ivan Stanković - redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Nataša Golić – naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Posle pregledane disertacije podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija Nevene Ivanović pod nazivom „**Uticaj oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na imunološke i metaboličke parametre miševa u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre**“ napisana je na 140 strana kucanog teksta formata A4, proreda 1,5 u tekstu i fonta Times New Roman (veličina 12). Sadržaj doktorske

disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (49 strana), Ciljevi istraživanja (1 strana), Materijal i metode (17 strana), Rezultati i diskusija (42 strana), Zaključci (4 strane) i Literatura.

Na početku doktorske disertacije dat je sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Sam tekst disertacije pisan je jasnim i preglednim stilom i sadrži 19 slika, 14 tabela i 372 literaturna navoda.

Poglavlje **Uvod** napisano je na 49 strana, a podeljeno je u 4 odeljka. U poglavlju **Uvod** je dat detaljan prikaz dosadašnjih saznanja iz oblasti koje su neposredno vezane za predmet disertacije. U prvom poglavlju uvoda pod naslovom „*Intestinalna mikrobiota i bakterije mlečne kiseline*“ dati su podaci o sastavu i ulozi gastrointestinalne mikrobiote, faktori koji utiču na sastav GI mikrobiote, kao i podaci o mehanizmima održavanja imunološke tolerancije domaćina na prisustvo simbiota. Takođe, data je definicija probiotika i bakterija mlečne kiseline (BMK), navedeni su osnovni rodovi koji se ubrajaju u probiotike i BMK, kao i detaljan opis povoljnih efekata, kako imunoloških, tako i metaboličkih, koji se dovode u vezu sa primenom BMK kao probiotika. U sledećem odeljku pod naslovom „*Nealkoholna masna bolest jetre*“ kroz 6 podnaslova dati su osnovni pojmovi vezani za faktore rizika za nastanak ovog oboljenja, njegovu prevalencu i vezu sa metaboličkim sindromom, tok bolesti, patogenezu. U odeljku pod nazivom „*Gojaznost i nealkoholna masna jetra*“ opisana je uloga gojaznosti, kao i najvažnijih adiponektina u razvoju nealkoholne masne jetre. U ovom odeljku je detaljno opisano na koji način promena sastava gastrointestinalne mikrobiote, uzrokovana pre svega dijetarnim faktorima, može dovesti do gojaznosti i razvoja ovog oboljenja. Drugi deo ovog odeljka govori o ravnoteži između metabolizma i imunskog odgovora, odnosno o ulozi adipoznog tkiva kroz produkciju hormona i citokina, na energetski status i na reaktivnost imunskog sistema. U odeljku „*Bakterije mlečne kiseline (probiotici) u tretmanu nealkoholne masne jetre (steatoze)*“ koji je podeljen u 2 podnaslova, detaljno je dat pregled literature o efikasnosti probiotika, pre svega BMK, u tretmanu nealkoholne masne jetre, kao i pregled mogućih mehanizama njihovog dejstva.

**Ciljevi** ove doktorske disertacije bili su sledeći: (i) Ispitati dejstvo oralne primene specifičnog soja BMK, *Lactobacillus rhamnosus* LA68, na imunski sistem i sastav masnih kiselina jetre i mozga kod mladih ženki miševa soja C57BL/6 u nepatološkim uslovima, pri standardnoj ishrani; (ii) Razviti model nealkoholne masne bolesti jetre (stadijum nealkoholne masne jetre) izazvane ishranom visokog sadržaja masti (VSM); (iii) Ispitati i izvršiti poređenje dejstva oralne primene dva različita soja BMK, *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1, na imunološke i metaboličke parametre, kao i na sastav masnih kiselina organa (jetra i drugi organi) kod mladih mužjaka miševa soja C57BL/6, koji će biti na režimu VSM ishrane; (iv) Ispitati uticaj *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na razvoj steatoze u modelu nealkoholne masne jetre; (v) Ispitati postojanost efekata *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na metaboličke parametre i sastav masnih kiselina organa nakon 8 nedelja *wash out* perioda pri uslovima VSM ishrane.

U poglavlju **Materijal i metode**, u delu *Materijal* tabelarno je prikazan spisak hemikalija, antitela i rastvora korišćenih u eksperimentalnom radu i dati su podaci o sastavu hrane koja je korišćena u eksperimentu, kao i podaci o korišćenim bakterijskim sojevima. U delu *Materijal* dati su i podaci o eksperimentalnim procedurama na životinjama za 3 faze eksperimenta: I faza - testiranje efekta *Lactobacillus rhamnosus* LA68 u uslovima standardne ishrane; II faza - poređenje efekta *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre; III faza - ispitivanje dužine trajanja uticaja oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre. U odeljku *Metode*, opisane su primenjene biohemijske metode za analizu krvi, postupak izolacije i stimulacije splenocita, određivanje njihove metaboličke aktivnosti primenom MTT testa, kao i fenotipizacija primenom protočne citometrije. Detaljno je opisan postupak ekstrakcije lipida iz organa i određivanje sastava masnih kiselina metodom gasne hromatografije. Poslednji deo ovog odeljka odnosi se na prikaz statističkih metoda korišćenih u obradi dobijenih rezultata.

Originalni rezultati koji su dobijeni u okviru ove doktorske disertacije prikazani su u poglavlju **Rezultati i diskusija**. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su prikazani kroz 15 slika i 7 tabela. Za svaku fazu istraživanja rezultati su pregledno i sistematično predstavljeni u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja. U istom poglavlju sa izloženim rezultatima, kandidat je poredio dobijene rezultate sa odgovarajućim rezultatima drugih autora.

U poglavlju **Zaključci** navedeni su najznačajniji zaključci koji su doneti na osnovu rezultata eksperimentalnog rada, kao i njihovog poređenja sa odgovarajućim literaturnim podacima.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (372) citiranih vankuverskim stilom.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Rezultati ispitivanja metaboličkih i imunoloških efekata nakon 4 nedelje oralne aplikacije *Lactobacillus rhamnosus* soja LA68 u uslovima standardne ishrane su dobijeni na mladim miševa soja C57BL/6, pri čemu je jedna grupa bila kontrolna. Oralna aplikacija *Lactobacillus rhamnosus* soja LA68 u uslovima standardne ishrane nije pokazala efekte na telesnu masu i biohemijske parametre kod mladih miševa ali je sastav masnih kiselina organa (jetre i mozga) miševa bio promenjen. Takođe, oralna aplikacija soja LA68 u uslovima standardne ishrane je pokazala imunomodulatornu aktivnost, odnosno dovela je do povećanog odgovora splenocita na nespecifičnu stimulaciju, do aktivacije Th1 imunskog odgovora i do pomeranja populacije splenocita ka granulocitnoj/monocitnoj lozi koja je važna komponenta urođenog imunskog odgovora i predstavlja prvu liniju odbrane od infekcije.

Rezultati ispitivanja metaboličkih i imunoloških efekata nakon 12 nedelja oralne aplikacije *Lactobacillus rhamnosus* soja LA68 i *Lactobacillus plantarum* soja WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre kod miševa soja C57BL/6 su dobijeni na zdravim mladim miševima soja C57BL/6. Šesnaest nedelja ishrane u kojoj je 41% energije poticao od masti je bio dovoljan da kod miševa soja C57BL/6 dovede do značajnog porasta telesne mase i razvoja steatoze koju je pratio poremećaj lipidnih parametara i porast nivoa leptina, što odgovara početnoj fazi

NAFLD (stadijum steatoze). U toku 16 nedelja VSM ishrane uočene su značajne promene u sastavu masnih kiselina organa, a naročito jetre gde je deponovanje masti, odnosno nastanak steatoze, bio povezan sa povećanjem sadržaja mononezasićenih masnih kiselina (MMK) i smanjenjem u ukupnom sadržaju zasićenih (ZMK) i polinezasićenih masnih kiselina (PMK). Histološka analiza uzoraka jetre je pokazala da je oralna aplikacija obe *Lactobacillus* vrste/soja u trajanju od 12 nedelja usporila razvoj steatoze u jetri u uslovima VSM ishrane. U uslovima eksperimentalno izazvane nealkoholne masne jetre, odnosno steatoze, aplikacija različitih sojeva (LA68 ili WCFS1) je pokazala različite efekte na metaboličke i imunološke parametre, pri čemu je izraženiji efekat zapažen kod soja WCFS1. Rezultati su pokazali da je aplikacija soja WCFS1 u uslovima VSM ishrane sprečila porast telesne težine, smanjila nivo serumskih triglicerida i LDL holesterola, a zapažen je i značajan porast u nivou leptina, dok je aplikacija soja LA68 sprečila porast telesne težine, ali je dovela do smanjenja serumskih nivoa UH i HDL holesterola. Sa aspekta sastava masnih kiselina organa, zapaženo je da je aplikacija oba soja u uslovima VSM ishrane dovela do promena u masnokiselinskom sastavu jetre ali nije imala značajan uticaj na sastav masnih kiselina lipida mozga. Nisu zapažene značajne razlike između dve *Lactobacillus* vrste/soja u efektu na masnokiselinski sastav jetre u toku režima VSM ishrane, ali je aplikacija *L. plantarum* WCFS1 imala izraženiji efekat u odnosu na kontrolnu grupu. Uočeno je da je najznačajnija promena u sastavu masnih kiselina jetre izazvana aplikacijom oba soja bilo povećanje u odnosu proizvod/prekursor n-3 serije masnih kiselina i ovaj odnos je bio isti kao i kod grupe koja je bila na standardnoj ishrani. Uzimajući u obzir da ovaj odnos uključuje aktivnost enzima  $\Delta$ -5 i  $\Delta$ -6 desaturaze i da je aktivnost ovih enzima poremećana kod gojaznih osoba sa NAFLD-om, postoji mogućnost da primena testiranih sojeva može reverzibilno da deluje na aktivnost navedenih enzima. Aplikacija soja WCFS1 je imala tendenciju povećanja citotoksične T ćelijske populacije (CD3+CD8+), značajnog smanjenja aktiviranih B i T ćelija i regulatornih ćelija (CD25+) i B ćelija (CD19+), a dovela je i do smanjenja u produkciji IL-6 i ćelijskoj proliferaciji/vijabilnosti nakon nespecifične stimulacije. Za razliku od soja WCFS1, aplikacija soja LA68 nije dovela do značajnih imunomodulatornih efekata kod miševa na VSM ishrani, pa bi prednost upotrebe LA68 soja u odnosu na WCFS1 u uslovima

ishrane visokog sadržaja masti, mogla da bude upravo blaža imunomodulatorna aktivnost.

Ispitivanje trajanja efekata oralne aplikacije *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1 na telesnu težinu, biohemijske parametre i sastav masnih kiselina organa posle 8 nedelja *wash out* perioda pokazalo je da su težine miševa i dalje bile manje u odnosu na grupu koja je bila samo na VSM ishrani, ali je izgubljen protektivni efekat na razvoj steatoze. Rezultati histološke analize uzoraka jetre su pokazali da je histološka slika bila ista kao kod grupe koja je samo bila samo na VSM ishrani. Nakon 8 nedelja od prestanka aplikacije *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1 izgubljeni su specifični efekti primenjenih sojeva na parametre lipidnog statusa, a došlo je i do porasta u serumskim nivoima leptina i insulina. Rezultati analize sastava masnih kiselina jetre su takođe pokazali da su izgubljene razlike u sadržaju pojedinih masnih kiselina uslovljenje aplikacijom korišćenih sojeva. U grupi koja je dobijala *Lactobacillus plantarum* WCFS1 zapažena je najveća koncentracija HDL holesterola u serumu, kao i najmanje smanjenje u sadržaja dugolančane PMK (eikozapentaenske kiseline) u jetri u odnosu na ostale grupe koje su bile na istom režimu ishrane, što može biti povoljan efekat ovog soja i nakon prestanka aplikacije.

### **C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Rezultati dobijeni u prvom delu istraživanja su pokazali da primena *L. rhamnosus* LA68 dovodi do promena u sastavu masnih kiselina organa, što se podudara sa literaturnim podacima, po kojima dobijeni efekat zavisi od primenjene bakterijske vrste/soja BMK [1-3]. Primena soja LA68 u toku 4 nedelje, dovela je do značajnog povećanja sadržaja palmitoleinske kiseline u lipidima jetre, ali nije imala uticaja na sadržaj omega-3 masnih kiselina u poređenju sa kontrolnom grupom, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom druge vrste/soja BMK [4]. Što se tiče uticaja na sastav masnih kiselina mozga, utvrđeno je da primena ovog soja dovodi do statistički značajnih promena u sastavu pojedinih masnih kiselina u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su pokazali da je oralna primena soja LA68 dovela do povećanja sadržaja

ZMK i PMK u odnosu na kontrolnu grupu, za razliku od podataka u literaturi prema kojima je primena druge vrste/soja BMK imala uticaj samo na sadržaj PMK [5, 6]. Rezultati dobijeni ispitivanjem efekata oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* soja LA68 na imunološke parametre kod miševa u uslovima standardne ishrane su pokazali da je aktivacija imunskog sistema u GIT-u, oralnom primenom soja LA68, dovela do sistemskih promena, s obzirom na promene u populaciji splenocita i razlike u nivou serumskih citokina u poređenju sa kontrolnom grupom što nije bilo u saglasnosti sa rezultatima istraživanja u kojem je korišćen drugi soja *L. rhamnosus* kod miševa drugog soja (Balb/c) [7]. Kod miševa koji su oralno dobijali soj LA68 nađeno je povećanje procenta CD11b+ ćelija čiji je funkcionalni značaj i značaj njihovog povećanja ranije rasvetljen u sličnom kontekstu u studiji u kojoj je za intervenciju korišćena druga *Lactobacillus* vrsta/soj [8]. Rezultati istraživanja su pokazali da primena soja LA68 dovodi do smanjenja zastupljenosti B i T ćelijskih populacija, naročito CD25+ ćelija, što je detektovano i u perifernoj krvi kod ljudi nakon uzimanja *L. rhamnosus* 271 [9]. U serumu životinja koje su oralno dobijale LA68 nađen je snižen nivo IL-10 i povećan nivo INF- $\gamma$  što nije bilo u potpunosti u saglasnosti sa rezultatima objavljenih od strane grupe autora koji su pratili uticaj oralne primene dva soja *L. rhamnosus* na serumski profil citokina, pri čemu je pokazano da oba soja, u različitom stepenu, dovode do povećanja i IL-10 i INF- $\gamma$  [10]. S obzirom da postoje razlike u efektima različitih *Lactobacillus* vrsta, koje mogu biti manje između različitih sojeva, ova neslaganje sa podacima iz literature može biti posledica jedinstvene aktivnosti našeg soja.

Drugi deo studije je bio dizajniran kako bi se ispitali efekti rane intervencije oralnom aplikacijom dva soja BMK na metaboličke i imunološke parametre u mišjem modelu NAFLD-a, uzrokovanog VSM ishranom. Rezultati merenja telesne težine, dobijeni praćenjem efekata oralne primene dva *Lactobacillus* soja tokom VSM ishrane, bili su u saglasnosti sa zapažanjima od strane drugih autora koji su takođe našli da aplikacija BMK dovodi do smanjenja u težini, a efekat je naročito bio izražen kod gojaznih životinja [11-16]. Oralna primena *L. plantarum* soja WCFS1 je dovela do značajnog sniženja triglicerida i LDL holesterola, što je bilo u saglasnosti sa literaturnim podacima o hipoholesterolemijskom efektu *L. plantarum*-a [12, 17, 18]. Oralna aplikacija *L. rhamnosus* soja LA68 je pokazala jači efekat na snižavanje UH i HDL holesterola ali ovakav efekat na parametre lipidnog statusa nije uočen primenom drugih sojeva *L.*

*rhamnosus* [13, 19, 20]. Kod svih grupa koje su bila na VSM ishrani, nađeni su povišeni nivoi leptina, pri čemu je najveća koncentracija nađena u grupi koja je oralno dobijala *L. plantarum* WCFS1. Dobijeni rezultati merenja koncentracije leptina nisu odgovarali smanjenju telesne težine kod grupa kojima su oralno dobijale laktobacile, s obzirom da serumske koncentracije leptina koreliraju sa procentima telesnih masti, odnosno viši nivoi leptina prisutni su kod gojaznih osoba [21, 22]. Rezultati smanjenja steatoze jetre nakon primene dve vrste/soja BMK su bili u saglasnosti sa podacima iz literature [12]. U cilju detektovanja prisutne inflamacije, u serumu životinja su merene vrednosti TNF- $\alpha$ . Rezultati nižih koncentracija TNF- $\alpha$  u grupama su bili u saglasnosti sa podacima u literaturi u kojima je pokazano da aplikacija određenih sojeva BMK u modelu nealkoholne masne jetre dobijenog VSM ishranom može da redukuje nivo ovog inflamatornog citokina [23, 24]. U cilju dobijanja slike o *in vivo* stanju imunskog sistema i boljeg razumevanja rezultata dobijenih u eksperimentu poliklonske stimulacije splenocita, u studiji je analizirana zastupljenost pojedinih populacija leukocita. Rezultati istraživanja su pokazali da je aplikacija soja WCFS1 dovela do povećanja citotoksične T ćelijske populacije (CD3+CD8+), značajnog smanjenja aktiviranih B i T ćelija i regulatornih ćelija (CD25+) i B ćelija (CD19+), a dovela je i do smanjenja u produkciji IL-6 i ćelijske proliferacije/vijabilnosti nakon nespecifične stimulacije. Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje uticaja aplikacije BMK na zastupljenost pojedinih populacija leukocita, kao i na njihovu reaktivnost u modelu nealkoholne masne jetre.

S obzirom da je NAFLD povezana sa promenama u metabolizmu masnih kiselina [25], bilo je od interesa ispitati promene u sastavu masnih kiselina u uslovima VSM ishrane, i to ne samo jetre, već i mozga, organa sa veoma intezivnom metaboličkom aktivnošću i sa velikim udelom lipida u ukupnoj masi. Rezultati određivanja sastava masnih kiselina jetre u uslovima VSM ishrane ukazuju da je deponovanje masnih kiselina u jetri povezano sa povećanjem sadržaja MMK u jetri što je i nađeno kod alkoholne i nealkoholne masne bolesti jetre [26, 27]. Značajno smanjenje u ukupnim PMK, uključujući i n-3 i n-6 PMK, koje je nađeno u jetri miševa koji su bili na VSM ishrani, u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora koji su takođe objavili smanjenje u sadržaju PMK u lipidima jetre kod NAFLD-a [27-29]. Rezultati određivanja sastava masnih kiselina mozga ukazuju da je masnokiselinski sastav i ovog organa promenjen pod uticajem dijetarnih masti. Naši rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem grupe autora

koji su objavili da dugotrajna ishrana bogata zasićenim mastima povećava sadržaj ZMK u ukupnim lipidima mozga, nema uticaja na sadržaj MMK, ali, za razliku od naših rezultata, dovodi do smanjenja u sadržaju dokozaheksaenske kiseline (DHA), omega-3 masne kiseline čije je zastupljenost direktno povezana sa boljim kognitivnim sposobnostima [30]. Rezultati analize sastava masnih kiselina nakon aplikacije BMK u uslovima VSM ishrane su pokazali da je sastav masnih kiselina jetre značajno izmenjen nakon aplikacije BMK, ali nisu zapažene statistički značajne promene u sastavu masnih kiselina mozga. Takođe, nisu zapažene značajne razlike između dve korišćene *Lactobacillus* vrste/soja u efektu na masnokiselinski sastav jetre u toku režima VSM ishrane, ali je administracija *L. plantarum* WCFS1 imala izraženiji efekat. Po našem dosadašnjem saznanju ovo je jedina studija koja je analizirala uticaj BMK na sastav masnih kiselina organa u uslovima VSM ishrane.

Treći deo disertacije je pratio dužine trajanja efekata aplikacije BMK na metaboličke parametre, telesnu težinu i sastav masnih kiselina organa pri istom režimu ishrane, nakon 8 nedelja od prestanka aplikacije BMK i po našem dosadašnjem saznanju ovo je jedino istraživanje koje je pratilo dužinu trajanja pozitivnih efekata nakon primene BMK.

## Literatura:

1. Wall, R., et al., *Contrasting effects of Bifidobacterium breve NCIMB 702258 and Bifidobacterium breve DPC 6330 on the composition of murine brain fatty acids and gut microbiota*. Am J Clin Nutr, 2012. 95(5): p. 1278-87.
2. Wall, R., et al., *Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues*. Am J Clin Nutr, 2009. 89(5): p. 1393-401.
3. Rosberg-Cody, E., et al., *Recombinant lactobacilli expressing linoleic acid isomerase can modulate the fatty acid composition of host adipose tissue in mice*. Microbiology, 2011. 157(Pt 2): p. 609-15.
4. Barrett, E., et al., *Bifidobacterium breve with alpha-linolenic acid and linoleic acid alters fatty acid metabolism in the maternal separation model of irritable bowel syndrome*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e48159.
5. Wall, R., et al., *Impact of administered bifidobacterium on murine host fatty acid composition*. Lipids, 2010. 45(5): p. 429-36.
6. Fukushima, M., et al., *Effects of a mixture of organisms, Lactobacillus acidophilus or Streptococcus faecalis on delta6-desaturase activity in the livers of rats fed a fat- and cholesterol-enriched diet*. Nutrition, 1999. 15(5): p. 373-8.

7. Gill, H.S., et al., *Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019)*. Br J Nutr, 2000. 83(2): p. 167-76.
8. Chiba, Y., et al., *Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic Lactobacillus casei*. Immunology, 2010. 130(3): p. 352-62.
9. Rask, C., et al., *Differential effect on cell-mediated immunity in human volunteers after intake of different lactobacilli*. Clin Exp Immunol, 2013. 172(2): p. 321-32.
10. Villena, J., et al., *Orally administered Lactobacillus rhamnosus modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C)*. BMC Immunol, 2012. 13: p. 53.
11. Takemura, N., T. Okubo, and K. Sonoyama, *Lactobacillus plantarum strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet*. Exp Biol Med (Maywood), 2010. 235(7): p. 849-56.
12. Xie, N., et al., *Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet*. BMC Complement Altern Med, 2011. 11: p. 53.
13. Lee, H.Y., et al., *Human originated bacteria, Lactobacillus rhamnosus PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1761(7): p. 736-44.
14. Park, J.E., S.H. Oh, and Y.S. Cha, *Lactobacillus plantarum LG42 isolated from gajami sik-hae decreases body and fat pad weights in diet-induced obese mice*. J Appl Microbiol, 2014. 116(1): p. 145-56.
15. Sanchez, M., et al., *Effect of Lactobacillus rhamnosus CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women*. Br J Nutr, 2014. 111(8): p. 1507-19.
16. Karlsson, C.L., et al., *Effects on weight gain and gut microbiota in rats given bacterial supplements and a high-energy-dense diet from fetal life through to 6 months of age*. Br J Nutr, 2011. 106(6): p. 887-95.
17. Nguyen, T.D., J.H. Kang, and M.S. Lee, *Characterization of Lactobacillus plantarum PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects*. Int J Food Microbiol, 2007. 113(3): p. 358-61.
18. Jeun, J., et al., *Hypocholesterolemic effects of Lactobacillus plantarum KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice*. Nutrition, 2010. 26(3): p. 321-30.
19. Hatakka, K., et al., *Lactobacillus rhamnosus LC705 together with Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii JS administered in capsules is ineffective in lowering serum lipids*. J Am Coll Nutr, 2008. 27(4): p. 441-7.
20. Oksaharju, A., et al., *Effects of probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii JS supplementation on intestinal and systemic markers of inflammation in ApoE\*3Leiden mice consuming a high-fat diet*. Br J Nutr, 2013. 110(1): p. 77-85.
21. Jequier, E., *Leptin signaling, adiposity, and energy balance*. Ann N Y Acad Sci, 2002. 967: p. 379-88.
22. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. 334(5): p. 292-5.

23. Li, C., et al., *Lactobacillus plantarum* NCU116 improves liver function, oxidative stress and lipid metabolism in rats with high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease. *Food Funct*, 2014. 5(12): p. 3216-23.
24. Raso, G.M., et al., *Effects of a Lactobacillus paracasei* B21060 based synbiotic on steatosis, insulin signaling and toll-like receptor expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem*, 2014. 25(1): p. 81-90.
25. de Almeida, I.T., et al., *Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis*. *Clin Nutr*, 2002. 21(3): p. 219-23.
26. de la Maza, M.P., et al., *Fatty acid composition of liver total lipids in alcoholic patients with and without liver damage*. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996. 20(8): p. 1418-22.
27. Araya, J., et al., *Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. 106(6): p. 635-43.
28. Araya, J., et al., *Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients*. *Obesity (Silver Spring)*, 2010. 18(7): p. 1460-3.
29. Wang, X., et al., *Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease*. *Lipids Health Dis*, 2011. 10: p. 234.
30. Yu, H., et al., *Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice*. *Int J Dev Neurosci*, 2010. 28(3): p. 271-6.

#### **D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

U ovoj doktorskoj disertaciji je prvi put izvršena karakterizacija *Lactobacillus rhamnosus* soja LA68 kroz efekte oralne primene ovog soja kod C57BL/6 miševa koja je otkrila značajan uticaj soja LA68 na stimulaciju urođenog imunskog odgovora. Ovaj rezultat može biti naročito od značaja prilikom formulisanja proizvoda koji sadrži više različitih vrsta/sojeva BMK.

Doprinos ove disertacije je rezultat koji pokazuje da aktivna primena odabranih probiotskih sojeva ima povoljan efekat, pre svega, na metaboličke parametre kod laboratorijskih miševa na VSM ishrani, te se analizirani sojevi mogu preporučiti za kliničko testiranje kod NAFLD pacijenta.

Doprinos ove disertacije je rezultat koji ukazuje na kratku dužinu trajanja povoljnih efekata nakon prestanka primene BMK u uslovima VSM ishrane što upućuje na zaključak da je za održavanje povoljnih efekata probiotske suplementacije u tretmanu NAFLD neophodna i promena režima ishrane.

Doprinos ove disertacije je i što postavlja pitanje modulacije sastava masnih kiselina organa usled primene BMK, kako u uslovima standardne, tako i u uslovima VSM ishrane, koji bi trebalo da bude intenzivnije testiran s obzirom na sve širu upotrebu BMK kroz fermentisane mlečne proizvode i dodatke ishrani.

#### **D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

##### **Radovi u međunarodnim časopisima:**

1. Dimitrijevic R, **Ivanovic N**, Mathiesen G, Petrusic V, Zivkovic I, Djordjevic B, and Dimitrijevic LJ. (2014). Effects of Lactobacillus rhamnosus LA68 on the immune system of C57BL/6 mice upon oral administration. *Journal of Dairy Research*, 81(02): 202-207. **(M21)**
2. **Ivanovic N**, Minic R, Djuricic I, Dimitrijevic LJ, Sobajic S, Zivkovic I, and Djordjevic B. (2014). Brain and liver fatty acid composition changes upon consumption of Lactobacillus rhamnosus LA68. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 66(1): 93-97. **(M23)**
3. **Ivanovic N**, Minic R, Dimitrijevic LJ, Radojevic Skodric S, Zivkovic I, and Djordjevic B. (2015). Lactobacillus rhamnosus LA68 and Lactobacillus plantarum WCFS1 differently influence metabolic and immunological parameters in high fat diet-induced hypercholesterolemia and hepatic steatosis. *Food & Function*, 6: 558-565. **(M21)**
4. **Ivanovic N**, Minic R, Djuricic I, Radojevic Skodric S, Zivkovic I, Sobajic S and Djordjevic B. (2016). Active Lactobacillus rhamnosus LA68 or Lactobacillus plantarum WCFS1 administration positively influences liver fatty acid composition in mice on a HFD regime. *Food & Function*, 7: 2840-2848. **(M21)**

### Saopštenja na skupovima međunarodnog značaja (M34):

- Minic R, **Ivanovic N**, Zivkovic I, Rajnpreht I, Djordjevic B. Analysis of the durability of the beneficial effects of lactobacilli on mice fed high fat diet. Book of Abstracts, 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for microbiota and human health. Rome, 13-15. September, 2015.
- **Ivanovic N**, Dimitrijevic R, Stankovic I, Radojević Skodric S, Rajnpreht I, Djordjevic B. Probiotics strains *L. rhamnosus* LA68 and *L. plantarum* WCFS1 improve hypercholesterolemia and hepatic steatosis in mice with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. Abstract Book – 3rd International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional and Baby Foods, Naples, Italija 23-25. septembar 2014.
- Đorđević B, **Ivanović N**, Dimitrijević R, Stanković I, Dimitrijević LJ. Brain and liver fatty acid composition changes upon consumption of *L. rhamnosus* La68. The 14th International Conference Proceedings "Functional foods and bioactive compounds in the management of chronic inflammation", UCLA, 2013. USA, ISBN-13: 978-1491277850, 2013: 52-53.

### Saopštenja na skupu nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64):

- **Ivanović N**, Dimitrijević R, Dimitrijević Lj, Radojević Škodrić S, Živković I, Đorđević B. Imunološki i metabolički efekti konzumacije *Lactobacillus rhamnosus* LA68, Izvodi radova 6. Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd 15-19 oktobar 2014; 404-405; ISBN 978-86-918145-0-2
- Dimitrijevic R, **Ivanovic N**, Mathiesen G, Petrusic V, Zivkovic I, Djordjevic B, Dimitrijevic Lj. Efekti oralne primene *L. rhamnosus* LA68 na imuni sistem C57BL/6 miševa. Izvodi radova 4. Kongres o dijetetskim suplementima sa međunarodnim učešćem, Beograd 24-25. oktobar 2013. ISBN978-86-917167-07

## **F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE**

Pregledom završene doktorske disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u naučnim časopisima međunarodnog značaja. Na osnovu izloženog, može se zaključiti da rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pružaju originalan i značajan naučni doprinos u oblasti dijetarnih intervencija.

Uzimajući u obzir sve što je izloženo, predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj izveštaj i odobri kandidatu dipl. farm. Neveni Ivanović javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

**„Uticaj oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na imunološke i metaboličke parametre miševa u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre“**

---

Dr sc. Brižita Đorđević (mentor), vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Rajna Minić, naučni saradnik,  
Odsek za naučno istraživački rad,  
Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak

---

Dr sc. Ivan Stanković, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Nataša Golić – naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

U Beogradu, 06.07.2016. god.