

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU
Komisiji za posleddiplomske studije**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 08.03.2018. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata mag. farm. Miroslava Dinića pod nazivom:

„Uticaj bioaktivnih molekula laktobacila na procese autofagije i inflamacije u *in vitro* i *in vivo* sistemima“

Komisija u sastavu:

1. dr sc. Marina Milenković, redovni profesor (mentor), Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. dr Jovanka Lukić, naučni saradnik (mentor), Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
3. dr Jelena Đokić, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
4. dr Jelena Begović, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
5. dr sc. Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

pregledala je priloženu doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu sledeći:

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: „Uticaj bioaktivnih molekula laktobacila na procese autofagije i inflamacije u *in vitro* i *in vivo* sistemima“ sadrži sedam poglavlja: uvod, cilj rada,

materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključak i literatura. Na početku doktorske disertacije se nalazi rezime/abstract, dok se na kraju rada nalazi kratka biografija kandidata, potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije, korišćenju doktorske disertacije (obavezni Prilozi 1, 2 i 3) i prilog objavljenih radova koji čine deo doktorske disertacije.

Doktorska disertacija je napisana fontom Times New Roman (veličina 12), proreda 1,5 na 106 strana. Disertacija sadrži 21 sliku (3 u uvodu, 17 u rezultatima i 1 u diskusiji), 3 tabele u materijalima i metodama. Ukupan broj navedenih referenci iz literature je 201.

Uvod se sastoji iz tri dela. U svakom od delova prikazane su relevantne informacije koje su značajne za istraživanja koja su sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji.

U prvom delu uvoda kandidat je naveo značaj mikroorganizama kao neistraženog izvora za otkrivanje novih bioaktivnih jedinjenja koja se potencijalno mogu primeniti kao novi lekovi. Posebna pažnja usmerena je ka opisivanju uloge crevne mikrobiote u funkcionisanju gastrointestinalnog (GI) trakta i ističe se važnost otkrivanja bioaktivnih molekula koje sintetišu bakterije u složenim zajednicama. Nakon toga, kandidat iznosi osnovne informacije o bakterijama mlečne kiseline sa posebnim osvrtom na rod *Lactobacillus* i njegovoj ulozi u GI traktu. Takođe, opisana je primena različitih vrsta laktobacila kao probiotika.

U drugom delu uvoda opisani su osnovni mehanizmi probiotičkog dejstva laktobacila koji obuhvataju inhibiciju štetnog delovanja patogenih bakterija, (ii) jačanje epitelne barijere domaćina i (iii) modulaciju imunskog odgovora. Za svaki od navedenih mehanizama navedeni su različiti primeri iz literature koji opisuju raznovrsnost ovih efekata. Takođe, opisani su osnovni mehanizmi koji su uključeni u prepoznavanju bakterija od strane domaćina. Na kraju, zaključuje se da primena bioaktivnih molekula izolovanih iz laktobacila može imati sličan ili identičan efekat kao i probiotik. Svi molekuli koji su proizvod primarnog ili sekundarnog metabolizma ili bilo koji oslobođeni molekuli poreklom iz probiotika koji mogu da ostvare pozitivan efekat na zdravlje domaćina nazvani su postbiotici. U nastavku su detaljno okarakterisani površinski, sekretovani i unutarćelijski molekuli probiotika koji su odgovorni za njihov pozitivan efekat u domaćinu. Od površinskih molekula opisani su efekti peptidoglikana, teihoične i lipoteihoične kiseline, kapsularnih i egzopolisaharida, proteina površinskog sloja, fimbrija, flagela i lipopolisaharida. Kao predstavnici sekretovanih molekula opisani su različiti proteini (p40, p75,

laktocepin, serpin) i polifosfati, dok je od unutarćelijskih molekula najviše pažnje posvećeno nukleinskim kiselinama (DNK i RNK) i njihovom efektu na ćelije domaćina.

U trećem delu uvoda opisane su osnovne karakteristike bola i inflamacije. Zatim, opisani su tipovi i mehanizmi procesa autofagije i njena uloga kod hepatotoksičnosti izazvane lekovima. Kandidat predstavlja molekularne osnove procesa autofagije i njenu ulogu u patogenezi različitih bolesti. Kao primer selektivnog oblika autofagije, predstavljeni su mehanizmi PINK1-Parkin zavisne autofagije koja je odgovorna za eliminisanje oštećenih mitohondrija. Na kraju su predstavljena istraživanja koja povezuju probiotike i autofagiju. Sledeći deo ovog dela uvoda je posvećen opštim karakteristikama inflamacije. U ovom delu opisani su inicijatori, medijatori i efektori procesa inflamacije, kao i mehanizam urođenog inflamatornog odgovora usled infekcije. Kandidat je detaljno opisao medijatore inflamatornog odgovora i karakteristike inflamatornog bola, kao jednog od osnovnih znakova inflamacije sa posebnim osvrtom na molekule koji su odgovorni za aktivaciju nociceptora. Na kraju uvoda, predstavljen je pregled literature koja se tiče uticaja probiotika na različite tipove bola.

Ciljevi istraživanja postavljeni su u skladu sa savremenim istraživanjima u oblasti probiotika koja su usmerena ka izolaciji i karakterizaciji bioaktivnih molekula probiotika i ispitivanju njihovog dejstva na različite ćelijske procese. Imajući u vidu da laktobacili imaju potencijal da modulišu procese inflamacije i autofagije, odgovorne za nastanak bola, odnosno odbranu ćelija od oštećenja, glavni cilj ovog rada bio je testiranje mogućnosti primene postbiotika laktobacila u tretmanu inflamatornog bola i prevenciji oštećenja ćelija izazvanih primenom paracetamola. Postavljena su dva cilja istraživanja koja su jasno definisana i realizovana kroz dve faze istraživanja. Prvi cilj bio je ispitivanje uticaja bioaktivnih molekula laktobacila na proces autofagije u hepatocitima, *in vitro*, kao i protektivan efekat ovih molekula kod toksičnosti izazvane paracetamolom. Drugi cilj bio je analiza imunomodulatornog efekta egzopolisaharida EPS-CG11 soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11, *in vivo*. Ovi efekti su ispitivani u modelima inflamatornog bola i peritonitisa izazvanih karageninom kod Wistar pacova.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno su opisani materijal, protokoli i eksperimentalne procedure koji su korišćeni u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima. Sve metode koje su korišćene u eksperimentalnom radu predstavljaju najsavremenije metoda molekularne biologije, genetike i mikrobiologije. Predstavljeni su podaci o korišćenim eksperimentalnim životinjama, ćelijskim

linijama i supstancama, dizajn *in vitro* i *in vivo* eksperimenata, priprema ekstrakata i izolacija egzopolisaharida bakterija, bihevioralne eksperimentalne procedure, metode analize proteina i nukleinskih kiselina (Western blot, Elisa, qPCR), metode fizičko-hemijske karakterizacije egzopolisaharida i spektrofotometrijski testovi (MTT i LDH).

Rezultati su predstavljeni u obliku 17 slika i prate prethodno opisane dve faze istraživanja.

Diskusija se sastoji iz tri dela. U prvom delu kandidat je izneo tumačenje dobijenih rezultata u *in vitro* eksperimentima koji se odnose na uticaj bioaktivnih molekula bakterija na proces autofagije. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima koji su dostupni u relevantnoj literaturi. Drugi deo diskusije usmeren je na tumačenje rezultata *in vivo* eksperimenata u kojima je ispitan imunomodulatorni efekat egzopolisaharida EPS-CG11 soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. Na kraju, u trećem delu diskusije, kandidat sumira dobijene rezultate i ističe njihov značaj sa stanovišta primene bioaktivnih molekula laktobacila u terapiji bola.

U poglavlju **Zaključci** navedeni su najznačajniji zaključci koji su proistekli iz dobijenih rezultata i navedenih ciljeva istraživanja.

U poglavlju **Literatura** navedena je 201 referenca.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati ove doktorske disertacije podeljeni su u dve celine i prate vremensku podelu istraživanja na dva seta eksperimenata (*in vitro* i *in vivo*).

Rezultati prvog seta eksperimenata odnose se na *in vitro* testiranje uticaja bioaktivnih molekula laktobacila na proces autofagije u HepG2 ćelijskoj liniji. U ovom istraživanju pripremljeni su ekstrakti tri soja laktobacila (*Lactobacillus fermentum* BGHI14, *Lactobacillus fermentum* BGHV110 i *Lactobacillus salivarius* BGHO1) koji predstavljaju skup najrazličitijih agonista za receptore koji prepoznaju karakteristične molekulske obrasce bakterija (engl. *Pattern-Recognition Receptors*, PRRs). Na osnovu dobijenih rezultata, izdvojio se ekstrakt pripremljen od soja *Lactobacillus fermentum* BGHV110 koji je stimulisao autofagiju u HepG2 ćelijama. Aktivirana autofagija potvrđena je povećanom konverzijom LC3 proteina, kao i povećanom transkripcijom relevantnih gena (*BECN1*, *p62/SQSTM1*, *PINK1*). Dodatno, uočen je povećan nivo iRNK za *TGF-β* citokin za koji je pokazano da stimuliše autofagiju u hepatocitima. U skladu sa pokazanim pozitivnim efektom BGHV110 ekstrakta na proces autofagije u

hepatocitima, dalje je analiziran njegov potencijal da uspori ili umanjuje oštećenje ćelija izloženih toksičnoj koncentraciji paracetamola. Rezultati su pokazali da su ćelije koje su pored paracetamola tretirane i BGHV110 ekstraktom pokazale statistički značajno veću vijabilnost u poređenju sa ćelijama tretiranim samo paracetamolom. Paralelno sa testovima vijabilnosti analizirana je uloga autofagije u zaštitnom efektu BGHV110 ekstrakta. Rezultati su pokazali da je intenzitet autofagije bio najizraženiji u ćelijama koje su pored paracetamola tretirane i BGHV110 ekstraktom. Tačnije, u ovim ćelijama detektovan je najveći stepen konverzije LC3 proteina i degradacije p62 proteina, kao i povećan nivo iRNK za *PINK1* i *p62/SQSTM1* gene u poređenju sa kontrolnim ćelijama ili ćelijama tretiranim samo paracetamolom. U cilju potvrde ovih rezultata analiziran je autofagni fluks koji odražava dinamiku samog procesa. Autofagni fluks analiziran je primenom autofagnog inhibitora hlorokina. Nakon primene BGHV110 ekstrakta i paracetamola u prisustvu hlorokina, detektovano je povećanje konverzija LC3 proteina u odnosu na nivo konverzije u ćelijama tretiranim samo hlorokinom, paracetamolom i hlorokinom i kontrolnim ćelijama. Primena hlorokina smanjila je zaštitni efekat BGHV110 ekstrakta čime je dobijena konačna potvrda da je ovaj efekat posredovan autofagijom.

Rezultati drugog seta eksperimenata odnose se na ispitivanje imunomodulatornog efekta egzopolisaharida EPS-CG11 soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11, *in vivo*. U cilju potvrde da je izolovani materijal polisaharid, urađena je mikroskopska analiza i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom. Za supstance koje imaju potencijal da se primene kao lekovi, ispitivanje termičke stabilnosti je od izuzetnog značaja kako bi se u postupcima proizvodnje izbegla potencijalna degradacija molekula. Primenom termogravimetrijskih metoda utvrđeno je da EPS-CG11 poseduje zadovoljavajuće termičke osobine i da može podneti različite tehnološke procese u kojima temperatura ne prelazi 150°C. U modelu inflamatornog bola kod pacova izazvanog intraplantarnom injekcijom karagenina, EPS-CG11 je ispoljio statistički značajno, dozno-zavisno antiedematozno i antihiperalgezijsko dejstvo nakon profilaktičke sistemske primene. Analiza ekspresije gena inflamatornih medijatora u inflamiranim šapicama ukazala je da EPS-CG11 svoj efekat ostvaruje regulišući ekspresiju *IL-1 β* citokina, a samim tim i ekspresiju *iNOS* gena. Takođe, detektovana je smanjena ekspresija mijeloperoksidaze koja se povezuje sa smanjenom infiltracijom i/ili aktivacijom neutrofila. Sa druge strane, EPS-CG11 je izazvao povećanje nivoa iRNK za *CD14* marker monocita, sugerišući uključenost monocita/makrofaga u rezoluciji inflamacije. U modelu peritonitisa izazvanog

intraperitonealnom primenom karagenina, EPS-CG11 je ispoljio imunosupresivni efekat. Ovaj zaključak je izveden na osnovu podataka da je nakon primene EPS-CG11 u peritoneumu detektovano smanjenje nivoa pro-inflamatornih medijatora (IL-1 β , TNF- α i iNOS), dok je koncentracija anti-inflamatornog IL-10 citokina bila povećana. Dodatno, povećana koncentracija IL-6 citokina ukazala je na njegovu ulogu u regulaciji intenziteta inflamacije. S obzirom da EPS-CG11 nije uticao na infiltraciju ćelija u modelu peritonitisa, može se zaključiti da je za imunosupresivni efekat neophodan direktan kontakt EPS-CG11 i imunskih ćelija.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Identifikacija i karakterizacija bakterijskih biomolekula koji interaguju sa receptorima eukariotskih ćelija predstavlja ključ za razumevanje mehanizama probiotičkog dejstva bakterija i funkcionisanja mikrobiote. Blage varijacije u strukturi površinskih molekularnih obrazaca koje postoje između bakterija diktiraju prirodu njihove interakcije sa ćelijskim receptorima i potencijalnim ko-receptorima (Lebeer i sar., 2010). Nova istraživanja ukazala su da su efekti probiotika u GI traktu u većoj meri posredovani površinskim ili sekretovanim molekulima. Svi ovi molekuli poreklom iz probiotika koji ostvaruju određeni pozitivan efekat na zdravlje domaćina nazvani su postbiotici (Tsilingiri i Rescigno, 2013). Najveći broj istraživanja bavio se ispitivanjem efekta postbiotika kod različitih oboljenja GI trakta. Međutim, ako se uzme u obzir bezbedna primena prečišćenih postbiotika, njihov efekat na druge sisteme organa, kao što su jetra ili periferni nervni sistem, je jako malo ispitan. Stoga ova doktorska disertacija daje značajan doprinos predstavljajući dva hipotetička mehanizma kojima postbiotici mogu doprineti terapiji bola delujući na jetru, periferni nervni sistem i imunski sistem.

Istraživanja koja su povezala autofagiju sa imunskim odgovorom, a posebno sa PRR, ukazala su jasno da crevna mikrobiota moduliše autofagiju (Delgado i sar., 2008). Bilo direktnim kontaktom ili posredstvom solubilnih medijatora rezultati ukazuju da laktobacili i bifidobakterije mogu da aktiviraju ili suprimiraju autofagiju u intestinalnim epitelnim ćelijama (IEĆ). Najveće istraživanje sprovedeno do sada pokazalo je da supernatanti bakterija *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus rhamnosus* GG indukuju autofagiju i ekspresiju proteina toplotnog stresa 27 (engl. *Heat Shock Protein 27*, HSP27) u humanoј epitelnoj ćelijskoј liniji C2BBe1 i na taj način štite epitelne ćelije od oksidativnog oštećenja uzrokovanog vodonik

peroksidom (Inaba i sar., 2016). Sa druge strane, primena živih probiotika suprimirala je autofagiju koju su aktivirali *Salmonella* Infantis i humani rotavirus u modelima infekcija kod prasića i zamoraca, čime je sprečena diseminacija salmonele i replikacija virusa (Wu i sar., 2013; Zhang i sar., 2018). Međutim, izuzev ovih eksperimenata usko vezanih za IEC, ne postoje podaci o uticaju postbiotika na proces autofagije u drugim ćelijama. U ovoj doktorskoj disertaciji prvi put je izučavan sinergistički efekat različitih površinskih i unutarćelijskih biomolekula probiotičkih sojeva na proces autofagije u hepatocitima. Činjenice da pojedini sojevi laktobacila mogu da suprimiraju oštećenje jetre izazvano oksidativnim stresom, alkoholom i patogenima ili ublažiti simptome hepatične encefalopatije, kao i prisustvo PRR u jetri, opravdavaju ispitivanje uticaja bioaktivnih molekula laktobacila na proces autofagije u hepatocitima (Forsyth i sar., 2009, Mencin i sar., 2009, Rishi i sar., 2009, Segawa i sar., 2008). Stimulatorni efekat BGHV110 ekstrakta na proces autofagije poslužio je kao odlična polazna osnova za ispitivanje njegove primene u *in vitro* modelu hepatotoksičnosti. Autofagija se pokazala kao važan mehanizam koji se aktivira u stanjima oštećenja hepatocita paracetamolom (Ni i sar., 2012). U ranijim studijama pokazano je da probiotici preko solubilnih medijatora mogu ublažiti oštećenje hepatocita izazvano paracetamolom. Tačnije, autori su pokazali da supernatanti sojeva *Lactobacillus acidophilus* MTCC447 i *Enterococcus lactis* IITRHR1 povećavaju nivo glutaciona, stimulišu ekspresiju anti-apoptotskog Bcl-2 proteina i smanjuju oksidativno oštećenje ćelija (Sharma i sar., 2011). Rezultati ove doktorske disertacije dopunili su već postojeća saznanja o mehanizmima koji su uključeni u zaštitni efekat postbiotika dodajući i autofagiju. Pored autofagije, povećana ekspresija *p62/SQSTM1* gena ukazala je na mogućnost aktivacije p62/SQSTM1–Keap1–Nrf-2 antioksidativnog signalnog puta (Ichimura i sar., 2013). Jones i sar. (2015) su opisali antioksidativni mehanizam kojim laktobacili ostvaruju zaštitni efekat u GI traktu, a koji uključuje aktivaciju NADPH oksidaze i Nrf-2 transkripcionog faktora. Dodatno, ova doktorska disertacija povezala je povećanu ekspresiju *p62/SQSTM1* gena sa laktobacilima i mogućnošću aktivacije Nrf-2 signalnog puta.

Bakterijski egzopolisaharidi dobijaju sve više na značaju kako se iz godine u godinu povećava broj studija koje ukazuju na nove efekte i polja moguće primene ovih polimera. Rezultati termičkih analiza u skladu su sa šemom dekompozicije koja je opisana u literaturi za egzopolisaharide koje proizvode *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus kefiranofaciens* (Ahmed i sar., 2013, Wang i sar., 2010). Polisaharidi različitog porekla su identifikovani kao

molekuli koji mogu ublažiti simptome inflamatornog bola. U najvećem broju istraživanja korišćeni su polisaharidi izolovani iz algi i lišajeva, dok EPS bakterija, a posebno probiotičkih sojeva, nikad nije razmatran kao mogući antihiperalgezijski agens (Chaves i sar., 2013, Córdova i sar., 2013). Rezultati primene EPS-CG11 u modelu karageninom izazvane inflamacije šapice kod Wistar pacova su u saglasnosti sa ostalim studijama koje su opisale primenu polisaharida kao agenasa koji smanjuju edem i hiperalgeziju. U tkivu šapica pacova koji su dobili EPS-CG11 detektovano je smanjenje nivoa iRNK za *IL-1 β* što je bilo u skladu sa rezultatima koji su predstavljeni za polisaharid glukomanan izolovan iz lišaja *Heterodermia obscurata*. Nivo mijeloperoksidaze koja odražava funkcionalnost neutrofila, a može ukazati i na stepen migracije ćelija, bio je smanjen kod životinja tretiranih EPS-CG11. Ovaj efekat često prati dejstvo polisaharida i većina istraživanja ukazuju na smanjenu aktivnost mijeloperoksidaze u šapicama glodara (Pereira i sar., 2014).

Kao što je već uočeno u inflamiranom tkivu šapica, u modelu peritonitisa nivo iRNK za *IL-1 β* i *iNOS* gene pokazao je isti stepen smanjenja u pacovima tretiranim intraperitonealno sa EPS-CG11 i karageninom u poređenju sa karageninskom kontrolom. Dodatno, EPS-CG11 smanjio je nivo TNF- α citokina, povećao nivo IL-10 i IL-6 citokina, dok na stepen infiltracije ćelija nije uticao. Ovaj model se pokazao kao izuzetno pogodan za izučavanje infiltracije i funkcije neutrofila u akutnom inflamatornom odgovoru (Barth i sar., 2016). Da smanjenje produkcije pro-inflamatornih citokina ne mora da zavisi od stepena infiltracije neutrofila ilustruju rezultati istraživanja koje su sprovedli Hassimotto i sar. (2013). Ova grupa je pokazala da sličan efekat kao EPS-CG11 ostvaruje i antocijanin, cijanidin-3-glukozid, kada se primenjuje profilaktički.

Literatura

Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A., Khan, S.T., 2013. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir – Part II. Food Hydrocoll. 30, 343–350.

Barth, C.R., Funchal, G.A., Luft, C., de Oliveira, J.R., Porto, B.N., Donadio, M.V.F., 2016. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. Eur. J. Immunol. 46, 964–970.

Chaves, L. de S., Nicolau, L.A.D., Silva, R.O., Barros, F.C.N., Freitas, A.L.P., Aragão, K.S.,

- Ribeiro, R. de A., Souza, M.H.L.P., Barbosa, A.L. dos R., Medeiros, J.-V.R., 2013. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35, 93–100.
- Córdova, M.M., Martins, D.F., Silva, M.D., Baggio, C.H., Carbonero, E.R., Ruthes, A.C., Iacomini, M., Santos, A.R.S., 2013. Polysaccharide glucomannan isolated from *Heterodermia obscurata* attenuates acute and chronic pain in mice. *Carbohydr. Polym.* 92, 2058–2064.
- Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G., Deretic, V., 2008. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 27, 1110–21.
- Forsyth, C.B., Farhadi, A., Jakate, S.M., Tang, Y., Shaikh, M., Keshavarzian, A., 2009. *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 43, 163–172.
- Hassimotto, N.M.A., Moreira, V., Nascimento, N.G. do, Souto, P.C.M. de C., Teixeira, C., Lajolo, F.M., 2013. Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–10.
- Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y., Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., Saito, T., Yang, Y., Kouno, T., Fukutomi, T., Hoshii, T., Hirao, A., Takagi, K., Mizushima, T., Motohashi, H., Lee, M.-S., Yoshimori, T., Tanaka, K., Yamamoto, M., Komatsu, M., 2013. phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell* 51, 618–631.
- Inaba, Y., Ueno, N., Numata, M., Zhu, X., Messer, J.S., Boone, D.L., Fujiya, M., Kohgo, Y., Musch, M.W., Chang, E.B., 2016. Soluble bioactive microbial mediators regulate proteasomal degradation and autophagy to protect against inflammation-induced stress. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 311, G634–G647.
- Jones, R.M., Desai, C., Darby, T.M., Luo, L., Wolfarth, A.A., Scharer, C.D., Ardita, C.S., Reedy, A.R., Keebaugh, E.S., Neish, A.S., 2015. Lactobacilli modulate epithelial cytoprotection through the Nrf2 pathway. *Cell Rep.* 12, 1217–1225.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev.*

Microbiol. 8, 171–184.

- Mencin, A., Kluwe, J., Schwabe, R.F., 2009. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut* 58, 704–720.
- Ni, H.-M., Jaeschke, H., Ding, W.-X., 2012. Targeting autophagy for drug-induced hepatotoxicity. *Autophagy* 8, 709–710.
- Pereira, J.G., Mesquita, J.X., Aragão, K.S., Franco, Á.X., Souza, M.H.L.P., Brito, T. V., Dias, J.M., Silva, R.O., Medeiros, J.-V.R., Oliveira, J.S., Abreu, C.M.W.S., de Paula, R.C.M., Barbosa, A.L.R., Freitas, A.L.P., 2014. Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. *Carbohydr. Polym.* 108, 17–25.
- Rishi, P., Mavi, S.K., Bharrhan, S., Shukla, G., Tewari, R., 2009. Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in *Salmonella*-induced liver damage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 222–230.
- Segawa, S., Wakita, Y., Hirata, H., Watari, J., 2008. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 371–377.
- Sharma, S., Singh, R.L., Kakkar, P., 2011. Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during acetaminophen induced apoptosis in primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 49, 770–779.
- Tsilingiri, K., Rescigno, M., 2013. Postbiotics: what else? *Benef. Microbes* 4, 101–107.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., Bai, X., 2010. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr. Polym.* 82, 895–903.
- Wu, S., Yuan, L., Zhang, Y., Liu, F., Li, G., Wen, K., Kocher, J., Yang, X., Sun, J., 2013. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG mono-association suppresses human rotavirus-induced autophagy in the gnotobiotic piglet intestine. *Gut Pathog.* 5, 22.
- Zhang, W., Zhu, Y.-H., Yang, G.-Y., Liu, X., Xia, B., Hu, X., Su, J.-H., Wang, J.-F., 2018. *Lactobacillus rhamnosus* GG affects microbiota and suppresses autophagy in the intestines of pigs challenged with *Salmonella Infantis*. *Front. Microbiol.* 8, 2705.

D. OBJAVLJENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije objavljeni su u dva časopisa sa SCI liste kategorije M21 i predstavljeni u obliku dva saopštenja na naučnim skupovima. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku:

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

Dinić, M., Lukić, J., Đokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N., Begović, J., 2017. *Lactobacillus fermentum* postbiotic-induced autophagy as potential approach for treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Front. Microbiol.* 8, 594. (IF=4.076)

Dinić, M., Pecikoza, U., Đokić, J., Stepanović-Petrović, R., Milenković, M., Stevanović, M., Filipović, N., Begović, J., Golić, N., Lukić, J., 2018. Exopolysaccharide Produced by Probiotic Strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 Reduces Inflammatory Hyperalgesia in Rats. *Front. Pharmacol.* 9, 1. (IF=4.400).

Radovi saopšteni na međunarodnim skupovima štampani u izvodu (M34):

Dinić, M., Lukić, J., Đokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N., Begović, J., 2016. The role of postbiotic-induced autophagy in maintaining epithelial barrier function. 13th Congress of Nutrition, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts p. 228.

Radovi saopšteni na nacionalnim skupovima štampani u izvodu (M64):

Dinić, M., Lukić, J., Đokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N., Begović, J., 2017. *Lactobacillus fermentum* BGHV110 postbiotics alleviate acetaminophen-induced hepatotoxicity by promoting protective autophagy response. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts p. 194.

E. ZAKLJUČAK I OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Rezultati ove doktorske disertacije donose nova ili dopunjena saznanja o mehanizmima probiotičkog dejstva laktobacila. Najveći broj podataka o upotrebi probiotika kao adjuvantnih i pomoćnih suplemenata u terapiji bola potiče iz eksperimenata na životinjama koji ukazuju da probiotici mogu da modulišu visceralne senzacije u GI traktu. Takođe, pokazano je da smanjenje visceralnog bola kod pacova može biti posredovano i ubijenim bakterijama i njihovim solubilnim produktima sugerišući da površinski i sekretovani bioaktivni molekuli laktobacila (postbiotici) doprinose ovom efektu. Imajući u vidu pozitivan uticaj postbiotika u modelima bola, ovaj rad je predstavio dva hipotetička mehanizma kojima postbiotici mogu doprineti terapiji bola. Prvo, egzopolisaharid testiranog probiotičkog soja ostvario je analgetički efekat u modelu inflamatornog bola delujući preventivno na pojavu bolne preosetljivosti i edema. Ovaj efekat predstavlja novu osobinu egzopolisaharida i može uputiti na testiranje analgetičkog efekta i drugih bioaktivnih molekula probiotika. Drugo, hepatotoksičnost predstavlja uobičajni neželjeni efekat primene standardnih analgetika, kao što je paracetamol. U ovoj studiji pokazano je da je autofagija mehanizam pomoću koga postbiotici mogu sprečiti oštećenje hepatocita uzrokovano toksičnim metabolitima analgetika, što je od veoma važnog značaja za predisponirane osobe. Kombinovanje identifikovanih aktivnih jedinjenja probiotika sa hepatotoksičnim lekovima predstavlja novu strategiju kojom se može sprečiti oštećenje hepatocita. U oba istraživanja postbiotici ostvaruju profilaktički efekat pa bi njihovu moguću primenu trebalo razmatrati sa stanovišta preventivne suplementacije.

F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom „**Uticaj bioaktivnih molekula laktobacila na procese autofagije i inflamacije u *in vitro* i *in vivo* sistemima**“ kandidata mag. farm. Miroslava Dinića, po svom sadržaju i obliku ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos za oblast Farmaceutske mikrobiologije.

Komisija u navedenom sastavu sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji kandidata mag. farm. Miroslava Dinića i odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 06.04.2018.

Članovi Komisije

dr sc. Marina Milenković, redovni profesor (mentor),
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jovanka Lukić, naučni saradnik (mentor),
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Đokić, naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Begović, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr sc. Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor,
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu