

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 06. 09. 2019. године, на основу молбе ментора, др Маје Толиначки, вишег научног сарадника, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и др Бранка Јовчића, ванредног професора, Универзитета у Београду – Биолошког факултета одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Светлане С. Соковић Бајић докторанда, истраживача сарадника, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду под насловом: „Карактеризација млечнокиселинских бактерија произвођача γ -аминобутерне киселине и њихова улога у превенцији и третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“, у саставу: др Маја Толиначки, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, др Бранко Јовчић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Јелена Ђокић, научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду и др Јелена Лозо, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата/кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Светлане С. Соковић Бајић под насловом “Карактеризација млечнокиселинских бактерија произвођача γ -аминобутерне киселине и њихова улога у превенцији и третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса” представља оригинално истраживање које за тему има анализу продукције γ -аминобутерне киселине од стране млечнокиселинских бактерија, проучавање пробиотичких карактеристика

млечнокиселинских бактерија произвођача γ -аминобутерне киселине и имуномодулаторних карактеристика одабраног соја, произвођача γ -аминобутерне киселине, у моделима *in vitro* и изучавање улоге одабраног соја, произвођача γ -аминобутерне киселине, на побољшање клиничке слике експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса, животињског модела мултипле склерозе.

Ова докторска дисертација је урађена у Лабораторији за молекуларну микробиологију Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, у оквиру пројекта "Изучавање гена и молекуларних механизма у основи пробиотичке активности бактерија млечне киселине изолованих са подручја Западног Балкана (ОИ 173019)" у сарадњи са Одељењем за имунологију Института за биолошка истраживања „Синша Станковић“.

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима и Списак литературе. Докторска дисертација написана је на 136 страница (проред 1,5), садржи 29 слика и 8 табела. Дисертација је подељена на 7 поглавља: **Увод** (1-28 страна), **Циљеви рада** (29-30 страна), **Материјал и методе** (31-54 страна), **Резултати** (55-88 стране), **Дискусија** (89-109 стране), **Закључци** (110-113 стране) и **Списак литературе** (114-136 страна). Поред наведеног у прилогу садржи: Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације, Изјаву о коришћењу, као и научне радове објављене у научним часописима са ISI листе који су директно проистекли из докторске дисертације.

Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи седам потпоглавља. У њему су сажето приказани литературни подаци који су непосредно повезани са темом докторске дисертације.

У потпоглављу „ γ -аминобутерна киселина“ описане су основне карактеристике γ -аминобутерне киселине, начин синтезе код прокариота и еукариота као и улога γ -аминобутерне киселине у живим системима. У оквиру потпоглавља „Физиолошке улоге γ -аминобутерне киселине“ наведене су физиолошке улоге γ -аминобутерне киселине у

нервном систему, кардиоваскуларном систему и гастроинтестиналном тракту и наведени су начини на које γ -аминобутерна киселина учествује у комуникацији између гастроинтестиналног тракта и ентеричког нервног система. Описана је повезаност недостатка γ -аминобутерне киселине са развојем различитих поремећаја и болести нервног система: депресије, несанице, раздражљивости, анксиозности и епилепсије. Поред наведених психолошких ефеката описане су и улоге γ -аминобутерне киселине у третманима дијабетеса, гојазности и повишеног крвног притиска. У оквиру одељка „Имуномодулаторни ефекат γ -аминобутерне киселине“ описани су ефекти које γ -аминобутерна киселина оставрује на имунске ћелије путем компоненти ГАБАергичког система као и продукција γ -аминобутерне киселине у имунским ћелијама. У потпоглављу „ γ -аминобутерна киселина бактерија“ описана је улога γ -аминобутерне киселине и глутамат зависног система отпорности на киселе услове (енгл. *Glutamate-dependent acid resistance system, GDAR*) бактерија у толеранцији на киселе услове средине и производњи метаболичке енергије. У потпоглављу „Млечнокиселинске бактерије“ истакнут је велики диверзитет наведене групе бактерија, различита станишта која насељавају и њихове биохемијске разлике. Такође је истакнут значај различитих родова млечнокиселинских бактерија и описана њихова примена у производњи широког спектра ферментисаних производа. Описан је утицај лактобацила на здравље, а дати су и различити примери пробиотичког деловања лактобацила. У одељку „Бактерије произвођачи γ -аминобутерне киселине“ указано је на врсте млечнокиселинских бактерија за које је показано да имају способност продукције γ -аминобутерне киселине и наведени су примери утицаја бактерија, произвођача γ -аминобутерне киселине на здравље домаћина. Потпоглавље „Механизми деловања пробиотика“ бави се механизмима којима пробиотичке бактерије остварују своје функције и критеријумима одабира пробиотичких сојева. У оквиру одељка „Инхибиција штетног деловања патогена“ описани су механизми путем којих пробиотици утичу на раст других врста. Одељак „Јачање епителне баријере“ бави се грађом и функцијом интестиналне епителне баријере, а у оквиру одељка су описани и до сада доступни литературни подаци о утицају γ -аминобутерне киселине на ентероците и цревни интегритет у различитим стањима. У оквиру одељка „Имуномодулаторна активност пробиотика“ описан је ефекат пробиотика на имунски систем. У оквиру овог одељка су детаљно описани механизми урођеног и адаптивног имунског одговора и начини на које компоненте имунског система препознају микроорганизме. У наредном потпоглављу

„Аутофагија“ детаљно је описан процес аутофагије. Указано је на повезаност процеса аутофагије и инфламације. Додатно приказани су литературни подаци о утицају ГАБАергичке сигнализације на имунски одговор домаћина након инфекције и утицају неких врста лактобацила на стимулацију или супресију аутофагије. У оквиру потпоглавља „Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис, животињски модел мултипле склерозе“ описане су кључне патолошке карактеристике мултипле склерозе, механизми настанка овог обољења и улога глутамата и γ -аминобутерне киселине код пацијената оболелих од мултипле склерозе. Такође је описан најчешће коришћен животињски експериментални модел мултипле склерозе експериментални аутоимунски енцефаломијелитис.

У поглављу **Циљеви рада** јасно су дефинисани главни научни циљеви докторске дисертације, који су подељени у четири групе. У првој групи циљева дефинисани су циљеви везани за селекцију сојева млечнокиселинских бактерија који продукују γ -аминобутерну киселину и квантификацију продукције γ -аминобутерне киселине. Истраживања у вези са овим циљем су обухватила: 1. Одређивање присуства *gadB* гена, гена који кодира ензим глутамат декарбоксилазу која конвертује Л-глутамат до γ -аминобутерне киселине, у млечнокиселинским бактеријама колекције Лабораторије за молекуларну микробиологију; 2. Квалитативну анализу продукције γ -аминобутерне киселине танкослојном хроматографијом; 3. Квантификацију продуктиване γ -аминобутерне киселине у медијуму 48 сати старих култура сојева течном хроматографијом високих перформанси. У другој групи циљева дефинисани су циљеви у вези са испитивањем пробиотичких својстава одабраних сојева млечнокиселинских бактерија, произвођача γ -аминобутерне киселине, у моделима *in vitro*. Истраживања у вези са овим циљем су обухватила: 1. Преживљавање симулираних услова гастроинтестиналног тракта; 2. Резистенцију на антибиотике; 3. Анализу присуства желатинозне и хемолитичке активности; 4. Антимикробни потенцијал; 5. Адхезију за Сасо-2 ћелијску линију; 6. Ексклузију патогена и 7. Анализу интегритета епитела. У трећој групи циљева дефинисани су циљеви у вези са испитивањем имуномодулаторног потенцијала одабраног соја, који продукује γ -аминобутерну киселину, на моделима инфламације *in vitro* и *in vivo*. Истраживања у вези са овим циљем су обухватила: 1. Испитивање метаболичке активности и пролиферације ћелија изолованих из мезентеричних лимфних чворова *in vitro*; 2. Испитивање продукције цитокина *in vitro*; и 3. Испитивање улоге аутофагије у

инфламацији. Четврта група циљева обухватила је испитивање терапијског потенцијала одабраног соја, произвођача γ -аминобутерне киселине као и медијума културе истог соја добијеног након 48 сати гајења, на смањење инфламације *in vivo* на моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.

У поглављу **Материјал и методе** описане су савремене методе микробиологије, молекуларне генетике, биохемије и имунологије коришћене у реализацији наведених циљева. Садржи потпоглавља у којима су описани бактеријски изолати, као и детаљни методолошки поступци коришћени у овој тези. У потпоглављу „Бактеријски сојеви“ су приказани списак и подаци о сојевима који су изучавани у овој тези. У потпоглављу „Подлоге за раст бактерија“ су описани медијуми у којима су гајене бактерије као и услови у којима су расле (температура и аерација). Поступак за изолацију укупне ДНК из бактеријских ћелија описан је у потпоглављу „Метода за изоловање укупне дезоксирибонуклеинске киселине из млечнокиселинских бактерија“. Умножавање циљних ДНК фрагмената методом ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) као и списак прајмера су описани у потпоглављу „Умножавање фрагмената ДНК ланчаном реакцијом полимеразе“. Визуелизација тоталне бактеријске ДНК и ДНК фрагмената добијених PCR методом је вршена хоризонталном гел електрофорезом описаном у потпоглављу „Електрофореза ДНК“.

Методе коришћене за анализу продукције γ -аминобутерне киселине описане су оквиру потпоглавља „Анализа продукције γ -аминобутерне киселине“. Квалитативна анализа продуковане γ -аминобутерне киселине описана је у одељку „Танкослојна хроматографија“, док је начин квантификације продуковане γ -аминобутерне киселине описан у оквиру одељка „Течна хроматографија високих перформанси“. Методе испитивања пробиотичких особина сојева описане су у оквиру потпоглавља „Пробиотичка карактеризација одабраних сојева“ и то у оквиру одељака: „Преживљавање у симулираним условима гастроинтестиналног тракта“ и пододељка „Толеранција киселих услова желудачног сока рН 2 у присуству обраног млека, протеина млека и муцина“, затим и одељака „Тест микродилуције“, „Тест хемолитичке активности“, „Тест желатинозне активности“ и „Антимикробна активност“. У оквиру потпоглавља „Ћелије коришћене у *in vitro* експериментима“ описано је да су у експериментима коришћена два типа ћелија: комерцијална Сасо-2 ћелијска линија, континуирана линија хетерогених епителних ћелија колоректалног аденокарцинома, и примарне ћелије добијене изоловањем

ћелија из мезентеричних лимфних чворова Dark agouti (ДА) пацова, као и начини њиховог узгајања. Адхезија одабраних сојева, произвођача γ -аминобутерне киселине, за Сасо-2 ћелије и њихова способност да компетитивно искључе везивање патогених бактерија *Escherichia coli* ATCC25922 и *Salmonella enterica* C29039 описани су у оквиру потпоглавља „Адхезија одабраних сојева, произвођача γ -аминобутерне киселине, за Сасо-2 ћелије“ и „Тест компетитивне ексклузије“. У потпоглављу „Анализа интегритета епитела, индукција инфламације са IL-1 β у Сасо-2 ћелијама и третмани супернатантима 48 сати старе културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17“ испитиван је ефекат супернатаната културе соја BGZLS10-17 са различитом концентрацијом γ -аминобутерне киселине на експресију иРНК гена који кодирају експресију протеина чврстих веза у диференцираним Сасо-2 ћелијама, а затим су Сасо-2 ћелије третиране са IL-1 β (да би се имитирали ефекти инфламације на епителну баријеру) и праћено је да ли третмани супернатантима културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17: са бактеријском γ -аминобутерном киселином, са синтетичком γ -аминобутерном киселином и супернатантом културе овог соја без γ -аминобутерне киселине неутралишу штетне ефекте које изазива IL-1 β . Ефекат супернатаната културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 на диференцираним Сасо-2 ћелијама праћен је тестовима описаним у потпоглављима „LDH есеј“, „Изолација РНК из ћелија“, Реверзна транскрипција“, „Квантитативни PCR“, „SDS-PAGE електрофореза“ и „Western blot“, преко праћења експресије иРНК протеина чврстих веза, експресије протеина клаудина и експресије IL-8 и TGF- β иРНК. Да би се испитао имуномодулаторни ефекат соја *Lb. brevis* BGZLS10-17, постављени су експерименти са две групе метода који су подељени на *in vitro* и *in vivo*. У потпоглављу „Експерименталне животиње“ описане су експерименталне животиње коришћене за испитивање имуномодулаторног потенцијала соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 *in vitro* и *in vivo*, а то су биле женке agouti ДА пацова узгајане на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“. Све експерименталне процедуре одобрене су од стране Етичке комисије Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (број дозволе 03-1/15). Изоловање ћелија мезентеричних лимфних чворова из ДА пацова и изолација ћелија описани су у оквиру потпоглавља „Изолација и третман ћелија мезентеричних лимфних чворова“. Цитотоксични ефекат, и утицај на метаболичку активност и пролиферацију ћелија мезентеричних лимфних чворова који остварују супернатанти културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 (са бактеријском γ -аминобутерном киселином, синтетичком γ -аминобутерном киселином и без овог метаболита) одређени су

LDH тестом, МТТ тестом, као и CFSE бојењем ћелија, што је описано у потпоглављима „LDH есеј“, „МТТ есеј“ односно „Одеђивање пролиферације ћелија изолованих из мезентеричних лимфних чворова“. Ефекти супернатаната културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 на продукцију цитокина ћелија мезентеричних лимфних чворова праћени су тестом ELISA описаним у оквиру потпоглавља „Квантификација цитокина“. Експресија *Foxp3* иРНК, маркера регулаторних Т ћелија, иРНК цитокина TGF- β , као и маркера аутофгије од стране ћелија мезентеричних лимфних чворова праћени су методама описаним у оквиру потпоглавља: „Изолација РНК из ћелија“, Реверзна транскрипција“ и „Квантитативни PCR“. Експресија једног од маркера аутофагије протеина LC 3, праћена је методом „Western blot“. Утишавање *ATG5* гена (енгл. *autophagy-related gene*) описано је у оквиру потпоглавља „РНК интерференција“. Експресија функционалних молекула на одабраним имунским ћелијама, као и повезаност аутофагије и имуносупресије, праћени су проточним цитофлуориметром што је описано у оквиру потпоглавља „Проточна цитофлуориметрија“. За испитивање ефекта живог соја *Lb. brevis* BGZLS10-17, као и супернатаната његове културе (са γ -аминобутерном киселином и без овог метаболита), у *in vivo* моделу коришћени су ДА пацови којима је индукован експериментални аутоимунски енцефаломијелитис што је описано у оквиру потпоглавља „Имуномодулаторни ефекат одабраног соја произвођача γ -аминобутерне киселине на моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса *in vivo*“. У последњем потпоглављу „Статистичка анализа“ су истакнути програми и тестови коришћени за обраду резултата добијених у овој тези.

У поглављу **Резултати** су приказани резултати истраживања добијени у овој тези. Ово поглавље се може груписати у три дела:

- селекција сојева који поседују *gadB* ген, ген који кодира ензим глутамат декарбоксилазу, те стога имају потенцијал да продукују γ -аминобутерну киселину, и анализа продукције γ -аминобутерне киселине,
- испитивање пробиотичких карактеристика одабраних сојева, произвођача γ -аминобутерне киселине, и
- испитивање имуномодулаторних карактеристика супернатаната културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 у моделима *in vitro* и испитивање имуномодулаторних карактеристика живог соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 и супернатаната његове културе *in vivo*.

Изолати који су коришћени у овој студији (n=303) су изоловани из руралних предела Републике Србије, Републике Хрватске и Босне и Херцеговине, са Кавказа и из Азербејџана из различитих аутохтоних млечних производа. Од 303 тестирана соја присуство *gadB* гена установљено је код 124 соја и то код 83 лактобацила, 15 лактокока, 11 леуконостока, 8 стрептокока, 6 ентерокока и 1 педиокока. Анализом продукције γ -аминобутерне киселине танкослојном хроматографијом показано је да 14 сојева лактобацила има способност продукције овог метаболита, док је течном хроматографијом високих перформанси измерена концентрација γ -аминобутерне киселине. С обзиром да је показано да је највећи број сојева који продукују γ -аминобутерну киселину пореклом из Златарског сира за наредне експерименте, експерименте анализе пробиотичког потенцијала, су одабрани само сојеви пореклом из наведеног сира. Критеријуми за селекцију пробиотичких сојева јесу способност да преживе неповољне услове гастроинтестиналног тракта (ГИТ), одсуство хемолитичке и желатинозне активности, осетљивост на антибиотике, способност везивања за интестиналне епителне ћелије и продукција антимикуробних једињења. Од 7 тестираних сојева, који продукују γ -аминобутерну киселину, а пореклом су из Златарског сира, 4 соја успешно преживљава симулиране услове ГИТ – а: *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 и BGZLS30-2. Током испитивања безбедносног статуса 4 соја који преживљавају симулиране услове ГИТ - а показано је да ни један сој не поседује ни желатинозну ни хемолитичку активност. Само 1 од 4 тестирана соја био је осетљив на све тестиране антибиотике, док су 3 преостала соја била резистентна на 1 до 3 тестирана антибиотика (ампицилин, канамицин и тетрациклин), међутим резистенција на канамицин и тетрациклин је урођена за лактобациле, а статистички јако мали број лактобацила је резистентно на ампицилин па се сматра да резистенција на наведене антибиотике није препрека за безбедну употребу сојева. Тестирани лактобацили се везују за Сасо-2 ћелије од 11 до 22 %, док су сва 4 тестирана соја показала висок степен редукције везивања патогених *E. coli* ATCC25922 и *S. enterica* C29039. Најпотентнију антимикуробну активност испољио је сој BGLMM10 на 11 од 18 тестираних патогена (*Bacillus cereus* ATCC11778, *B. spizizenii* ATCC6633, *Citrobacter freundii* ATCC43864, *E.coli* ATCC25922, *Listeria innocua* ATCC33090, *Proteus hauseri* ATCC13315, *P. mirabilis* ATCC12453, *Rhodococcus equi* ATCC6936, *S. enterica* C29039, *S. typhimurium* ATCC14028 и *Shigella sonnei* ATCC29930), док сој BGZLS10-17 није испољио антиикуробну активност ни према једном патогену. Показано је да третман

диференцираних Сасо-2 ћелија супернатантима културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са 1 mM, 2 mM и 4 mM γ -аминобутерне киселине статистички значајно стимулише експресију протеина чврстих веза на нивоу иРНК. Третман диференцираних Сасо-2 ћелија супернатантом културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са 4 mM γ -аминобутерне киселине статистички значајно је ублажио штетне ефекте инфламације изазване са IL-1 β на експресију иРНК протеина чврстих веза, као и на експресију протеина клаудина. Ниво експресије гена за *IL-8*, који је након третмана са IL-1 β статистички значајно био повећан о односу на нетретиране контролне ћелије, након третмана супернатантом културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са 4 mM γ -аминобутерне киселине статистички значајно је смањен, док је ниво експресије гена за *TGF- β* био статистички значајно повећан.

С обзиром да је у литературним подацима показано да је γ -аминобутерна киселина важан имуномодулаторни молекул испитиван је и имуномодулаторни профил супернатаната културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са 4 mM бактеријске или синтетичке γ -аминобутерне киселине и без овог метаболита у моделима *in vitro* и *in vivo*. У овој групи експериментат коришћене су ћелије мезентеричних лимфних чворова које су третиране са конканавалином (КонА) неспецифичним стимулатором имунских ћелија, што је широко прихваћен *in vitro* модел инфламације. Показано је да нетоксична концентрација супернатаната културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 (2,5 %) са 4 mM γ -аминобутерне киселине (бактеријске или синтетичке) или без овог метаболита статистички значајно смањује метаболичку активност, пролиферацију ћелија мезентерицних лимфних чворова и продукцију проинфламаторних цитокина IL-17 и IFN- γ , од стране ових ћелија, док супернатанти културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са γ -аминобутерном киселином остварују статистички значајније ефекте на све наведене процесе у односу на третман супернатантом културе овог соја без γ -аминобутерне киселине. Третмани супернатантима културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 Кон-А стимулираних ћелија мезентеричних лимфних чворова статистички значајно је повећао експресију иРНК Foxp3 и TGF- β , као и продукцију IL-10, док су супернатанти културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са γ -аминобутерном киселином остварили статистички значајније ефекте у односу на третман без овог метаболита. Анализа експресије LC3 протеина (једног од маркера аутофагије) показала је да третмани супернатантом културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са γ -аминобутерном киселином статистички значајно стимулишу аутофагију у ћелијама мезентеричних лимфних чворова. Анализа проточном цитофлуориметријом је показала да

је највећа експресија LC3 II протеина у CD4+T, CD8+T, NK (CD161+CD3-) i NKT (CD161+CD3+) ћелијама, а затим у дендритским ћелијама па у макрофагима и Б ћелијама. Третман супернатантима културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 статистички значајно су стимулисали експресију иРНК маркера аутофагије (ULK1, UVRAG, Becn1, ATG5, p62, LC3), док су само третмани супернатантима културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са γ -аминобутерном киселином статистички значајно стимулисали експресију GABARAP протеина, такође једног од маркера аутофагије. Утишавање *ATG5* гена методом РНК интерференције показало је да у имуносупресивни ефекти супернатаната културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са γ -аминобутерном киселином посредовани *ATG5* зависном аутофагијом, док су имуносупресивни ефекти супернатанта културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 без γ -аминобутерне киселине *ATG5*, Foxp3, IL-10 и TGF- β независни. *In vivo* примена живог соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 на моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса показала је да примена овог соја има терапијски учинак. Додатно, третман животиња супернатантима културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 статистички значајно је одложио почетак болести, али и ублажио симптоме у каснијим фазама болести.

Поглавље **Дискусија** је посвећено упоредној анализи резултата добијених у овој тези и података пореклом из досадашње научне литературе. У овом поглављу је истакнут значај и допринос добијених резултата у области микробиологије, фундаменталне молекуларне микробиологије, као и имунологије. Први део поглавља Дискусија се односи на анализу продукције γ -аминобутерне киселине од стране млечнокиселинских бактерија из колекције Лабораторије за молекуларну микробиологију у коме су детаљно описани и продискутовани резултати добијени у овом истраживању у односу на податке из литературе. Показано је да сојеви, произвођачи γ -аминобутерне киселине, изоловани из млека и ферментисаних млечних производа имају добру способност продукције γ -аминобутерне киселине, иако није детектован велики број ових сојева. У другом делу поглавља Дискусија је истакнут пробиотички потенцијал сојева произвођача γ -аминобуерне киселине. Поређењем резултата добијених током овог испитивања са подацима пореклом из досадашње научне литературе може се закључити да испитивани сојеви имају добар пробиотички потенцијал. Додатно је показано да супернатанти културе соја *Lb. brevis* BGZLS10-17 са γ -аминобутерном киселином подстичу продукцију молекула који доприносе заштити интестиналне епителне баријере, а доводе и до резолуције инфламације и успостављања хомеостазе имунског система. Сој *Lb. brevis* BGZLS10-17,

али и супернатант његове културе са γ -аминобутерномкиселином испољава терапијски ефекат у *in vivo* моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.

У поглављу **Закључци** су изнети закључци који се могу извести из резултата добијених у овој тези. Изнето је 20 појединачни закључак који се односе на анализу продукције γ -аминобутерне киселине од стране млечнокиселинских бактерија, испитивање пробиотичких карактеристика млечнокиселинских бактерија произвођача γ -аминобутерне киселине и испитивање имуномодулаторних карактеристика одабраног соја произвођача γ -аминобутерне киселине у моделима *in vitro* и *in vivo*.

У поглављу **Литература** је дата листа 267 извора литературе. Цитирани литературни извори су актуелни и омогућили су развој идеје за извођење овог истраживања, као и објашњење добијених резултата и доношење закључака. Наведени извори покривају све појединачне области овог истраживања и адекватно су наведени у самом тексту.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Sokovic Bajic, S.**, Djokic, J., Dinic, M., Veljovic, K., Golic, N., Mihajlovic, S., and Tolinacki, M. (2019). GABA-Producing Natural Dairy Isolate From Artisanal Zlatar Cheese Attenuates Gut Inflammation and Strengthens Gut Epithelial Barrier *in vitro*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 527. **(M21)**.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6431637/>
2. **Sokovic Bajic, S.**, Mihajlovic, S., Radojevic, D., Popovic, D., Djokic, J., Stanisavljevic, S., Lazarevic, M., Miljkovic, Dj., Ruas-Madiedo, P., Golic, N., and Tolinacki, M. (2019). Characterization of pH resistance and the proteolytic activity of GABA producing *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 in preparation of fermented milk beverage and the effects on the symptoms of the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of the Serbian Chemical Society*. **(M23)**
<http://www.shd-pub.org.rs/index.php/JSCS/article/view/8478>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Tolinacki, M., **Sokovic, S.**, Djokic, J., Zivkovic, M., Popovic, D., Mihajlovic, S. (2016). Evaluation of γ -aminobutyric acid (GABA) - producing lactobacilli as a potential

probiotics. The International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics – IPC2016. (M34)

2. **Soković Baijić, S.**, Djokić, J., Dinić, M., Popović, D., Golić, N., Mihajlović, S., Tolinački, M. (2018). Characterization of probiotic potential of GABA-producing natural isolate *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17. 1st International Conference on Microbial Food and Feed Ingredients (MiFFI), Copenhagen, Denmark. Book of abstracts, p. 65. (M34)

Б3. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Sokovic, S.**, Tolinacki, M., Mihajlovic, S., Veljovic, K., Popovic, N., Rodriguez, J., Ruas-Madiedo, P., Golic, N. (2016). Production of GABA by Lactobacilli with Probiotic potential. 13th Congress of Nutrition, Belgrade, Serbia, p. 230 (oral presentation). (M64)
2. **Sokovic Baijić, S.**, Mihajlovic, S., Popovic, N., Brdaric, E., Ruas-Madiedo, P., Golic N., Tolinacki, M. (2017) The ability of Lactobacilli from artisanal Zlata cheese to produce gamma-aminobutyric acid. First Congress of Molecular Biologists of Serbia, Belgrade, Serbia, September 20-22th, Book of Abstracts p. 206. (M64)
3. **Soković Baijić, S.**, Stanisavljević, S., Lazarevic, M., Popovic, D., Đokić, J., Miljković, Đ., Tolinački, M. (2018). Probiotički soj *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 ublažava simptome eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod DA pacova. HZ16 / FH16 U/O (oralna prezentacija). (M64)

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Карактеризација млечнокиселинских бактерија произвођача γ -аминобутерне киселине и њихова улога у превенцији и третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“, аутора Светлане С. Соковић Бајић, констатовано је да утврђено подударање текста износи 10%. Овај степен подударности последица је општих места и појмова, претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, личних имена и назива институција, а уочена је и подударност стандардних назива бактеријских родова и врста и назива протеина, назива болести која је коришћена као модел систем у овом раду, као и скраћеница. Све поменуто је у складу са чланом 9. Правилника и сматра се да докторска дисертација кандидаткиње Светлане С. Соковић Бајић представља оригинално научно дело.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација кандидата Светлане С. Соковић Бајић под насловом: **“Карактеризација млечнокиселинских бактерија произвођача γ -аминобутерне киселине и њихова улога у превенцији и третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса ”** представља оригиналан научни рад који се бави испитивањем пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика млечнокиселинских бактерија, произвођача γ -аминобутерне киселине. Резултати овог истраживања допринела су бољем разумевању улоге γ -аминобутерне киселине коју продукују млечнокиселинске бактерије у *in vitro* и *in vivo* моделима инфламације и њихову потенцијалну употребу у медицини за третман аутоимунских поремећаја. Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидата Светлане С. Соковић Бајић и омогући кандидату јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

У Београду, 10.09.2019. године

др Маја Толиначки, виши научни сарадник,
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
Универзитет у Београду

др Бранко Јовчић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Јелена Ђокић, научни сарадник
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
Универзитет у Београду

др Јелена Лозо, венредни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет