

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ



Нина Ж. Окука

**УТИЦАЈ КОМБИНАЦИЈЕ ДВА  
ПРОБИОТСКА СОЈА И ПОЛИКОЗАНОЛА  
НА МЕТАБОЛИЧКЕ ПАРАМЕТРЕ КОД  
ГОЈАЗНИХ ЖЕНА**

докторска дисертација

Београд, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY



Nina Ž. Okuka

**THE EFFECT OF THE TWO PROBIOTIC  
STRAINS AND POLICOSANOL  
COMBINATION ON METABOLIC  
PARAMETERS IN OBESE WOMEN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

## **Ментори:**

---

др сц. Брижита Ђорђевић, редовни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

---

др сц. Невена Ивановић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

## **Чланови Комисије:**

---

др сц. Мирјана Шумарац Думановић – редовни професор,  
Клиника за ендокринологију, дијабетес и метаболичке поремећаје,  
Универзитетски клинички центар Србије,  
Универзитет у Београду - Медицински факултет

---

Прим. др сц. Снежана Половина, виши научни сарадник,  
Клиника за ендокринологију, дијабетес и метаболичке поремећаје,  
Универзитетски клинички центар Србије,  
Универзитет у Београду - Медицински факултет

---

др сц. Неда Милинковић – доцент,  
Катедра за медицинску биохемију,  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

---

др сц. Рајна Милић - научни саветник,  
Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Горлак“

---

др сц. Ксенија Величковић – доцент,  
Катедра за биологију ћелије и ткива,  
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

**Датум одбране:** \_\_\_\_\_

## Утицај комбинације два пробиотска соја и поликозанола на метаболичке параметре код гојазних жена

**Сажетак:** Гојазност се карактерише дисбиозом гастроинтестиналне микробиоте, те се примена пробиотика сматра обећавајућим новим приступом у третману овог обољења. Циљ наше студије је био испитати утицај нове пробиотске формулације на метаболичке, инфламаторне, епигенетске и хематолошке параметре, хормоне који утичу на апетит, као и имуномодулаторни ефекат пробиотика. У студији је коришћена комбинација пробиотика и октакозанола, једињења са хипохолестеролемијским ефектом. Истраживање је трајало 12 недеља, а спроведено је као рандомизована, двоструко слепа, плацебо-контролисана студија, у којој су учествовале испитанице са ИТМ = 30,0 – 39,9 kg m<sup>-2</sup>. Интервентна група (N = 25) је пила по 1 капсулу дневно у којој се налазило 7 x 10<sup>10</sup> CFU *Lactiplantibacillus plantarum* 299v, 5 x 10<sup>9</sup> CFU *Saccharomyces boulardii* и 40 mg октакозанола, док је контролна група (N = 23) пила плацебо. Примена пробиотске формулације након 12 недеља је резултовала значајно нижим концентрацијама проинфламаторних параметара, док су концентрације грелина и HDL-холестерола биле значајно више. Уочен је и регулаторни ефекат на експресију *miRNA* и *mRNA*, епигенетских маркера значајних у процесима метаболизма, инфламације и адипогенезе. Показано је да пробиотска формулација испољава позитиван ефекат на величину и облик еритроцита, као и на морфолошке карактеристике тромбоцита. Утврђен је имуномодулаторни ефекат који се огледа у смањеном проценту CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-ћелија, као и у повећаним концентрацијама *TGF-β1* након 12 недеља интервенције. Значајне промене у вредностима ИТМ између група нису забележене. Потенцијални утицај на нивое триглицерида, глукозе и инсулина захтева додатна истраживања, како би се нова дијетарна интервенција сматрала корисном адјувантном терапијом и ефикасном стратегијом у третману гојазности.

**Кључне речи:** гојазност, пробиотици, октакозанол, метаболички параметри, епигенетски маркери, имуномодулаторни ефекат;

**Научна област:** Фармација

**Ужа научна област:** Броматологија

## **The effect of the two probiotic strains and policosanol combination on metabolic parameters in obese women**

**Abstract:** Obesity is characterized by dysbiosis of the gastrointestinal microbiota, and the use of probiotics is considered a promising new approach in the treatment of this disease. The aim of this study was to examine the impact of a new probiotic formulation on metabolic, inflammatory, epigenetic and hematological parameters, appetite-related hormones, as well as the immunomodulatory effect of probiotics. Combination of probiotics and a hypocholesterolemic compound, octacosanol, was used in this study. The research lasted 12 weeks, and was conducted as a randomized, double-blind, placebo controlled study, where participated women with BMI = 30.0 - 39.9 kg m<sup>-2</sup>. Daily oral supplementation included  $7 \times 10^{10}$  CFU of *Lactiplantibacillus plantarum* 299v,  $5 \times 10^9$  CFU of *Saccharomyces boulardii*, and 40 mg of octacosanol or placebo. After 12 weeks of the intervention significantly lower concentrations of pro-inflammatory parameters were observed, while ghrelin and HDL-cholesterol concentrations were significantly higher. A regulatory effect on the *miRNA* and *mRNA* expression, epigenetic markers important in the processes of metabolism, inflammation and adipogenesis, was also observed. It has been shown that the probiotic formulation exerts a positive effect on the size and shape of erythrocytes, as well as on the morphological characteristics of platelets. Immunomodulatory effect was confirmed by the reduced percentage of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-cells, as well as in increased TGF- $\beta$ 1 concentrations. No significant changes in BMI values between groups were noted. Potential effect on triglyceride, glucose and insulin levels requires additional research, in order to consider new dietary intervention as a useful adjuvant therapy and an effective strategy in the obesity treatment.

**Key words:** obesity, probiotics, octacosanol, metabolic parameters, epigenetic markers, immunomodulatory effect

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific subfield:** Bromatology

# САДРЖАЈ

1	УВОД.....	1
1.1	Патофизиологија гојазности.....	2
1.1.1	Серотонин и допамин .....	2
1.1.2	Гастроинтестинални хормони .....	2
1.1.3	Дисфункција адипоцита .....	3
1.1.4	Медијатори инфламације.....	5
1.1.5	Генетски фактори.....	7
1.1.6	Епигенетика .....	7
1.1.7	Обољења повезана са гојазношћу .....	9
1.2	Терапија гојазности.....	10
1.2.1	Промене животних навика у третману гојазности .....	10
1.2.2	Фармакотерапија гојазности.....	11
1.3	Гастроинтестинална микробиота .....	14
1.4	Гастроинтестинална микробиота и гојазност .....	16
1.5	Пробиотици.....	20
1.5.1	Механизам деловања пробиотика .....	20
1.5.2	Критеријуми за карактеризацију пробиотика.....	33
1.6	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 299v.....	35
1.7	<i>Saccharomyces boulardii</i> (синоним <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> ).....	36
1.8	Октакозанол .....	38
2	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	41
3	ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ.....	42
3.1	Избор испитаница и дизајн студије.....	42
3.1.1	Избор испитаница .....	42
3.1.2	Дизајн студије .....	42
3.1.3	Протокол студије .....	43
3.2	Материјал за дијетарну интервенцију .....	44
3.3	Узорковање биолошког материјала .....	44
3.4	Методe.....	45
3.4.1	Антропометријски параметри .....	45
3.4.2	Одређивање основних биохемијских параметара .....	45
3.4.3	Одређивање адипоцитокина и хормона који имају утицај на апетит .....	45
3.4.4	Одређивање хематолошких параметара .....	49
3.4.5	Одређивање параметара хуморалног и целуларног имунитета .....	50

3.4.6	Одређивање епигенетских маркера.....	52
3.5	Статистичка анализа.....	54
4	РЕЗУЛТАТИ.....	55
4.1	Основни демографски подаци.....	55
4.2	Утицај пробиотске формулације на антропометријске параметре.....	55
4.3	Дијетарне навике.....	56
4.4	Утицај пробиотске формулације на метаболичке параметаре.....	57
4.5	Утицај пробиотске формулације на концентрације адипоцитокина.....	58
4.6	Утицај пробиотске формулације на концентрације хормона који имају утицај на апетит.....	59
4.6.1	Испитивање корелација адипоцитокина, хормона који регулишу апетити и метаболичких параметара.....	60
4.7	Утицај пробиотске формулације на хематолошке параметре.....	60
4.7.1	Процентуалне промене хематолошких параметара еритроцита и тромбоцита... 61	
4.7.2	Анализа морфолошких промена еритроцита и тромбоцита.....	62
4.7.3	Утицај пробиотске формулације на ниво фибриногена и <i>sP-selectin</i> .....	64
4.7.4	Корелације између ИТМ и хематолошких параметара.....	65
4.8	Утицај пробиотске формулације на одабране параметре хуморалног и целуларног имунитета.....	66
4.8.1	Одређивање нивоа антитела специфичних на микроорганизме коришћене у студији 66	
4.8.2	Анализа субпопулација лимфоцита у периферној крви.....	68
4.8.3	Утицај суплементације на нивое <i>TGF – <math>\beta 1</math></i> .....	69
4.8.4	Утицај суплементације на секрецију цитокина након <i>in vitro</i> стимулације ћелија периферне крви.....	70
4.9	Утицај пробиотске формулације на епигенетске маркере.....	71
4.9.1	Испитивање корелација епигенетских маркера са антропометријским и липидним параметрима.....	72
5	ДИСКУСИЈА.....	73
5.1	Утицај пробиотске формулације на антропометријске параметре.....	73
5.2	Утицај пробиотске формулације на нивое метаболичких параметара.....	74
5.3	Утицај пробиотске формулације на концентрације адипоцитокина.....	75
5.4	Утицај пробиотске формулације на концентрације хормона који имају утицај на апетит.....	76
5.5	Утицај пробиотске формулације на хематолошке параметре.....	78
5.6	Утицај пробиотске формулације на одабране параметре целуларног и хуморалног имунитета.....	80
5.6.1	Утицај пробиотске формулације на субпопулације лимфоцита у периферној крви	80



5.6.2	Утицај пробиотске формулације на концентрације TGF- $\beta$ 1 .....	81
5.6.3	Утицај суплементације на секрецију цитокина након <i>in vitro</i> стимулације ћелија периферне крви .....	82
5.6.4	Нивои антитела специфичних за пробиотске микроорганизме кориштене у студији	83
5.7	Утицај пробиотске формулације на епигенетске маркере .....	84
6	ЗАКЉУЧЦИ .....	88
7	ЛИТЕРАТУРА .....	90
8	Прилози .....	109
8.1	Објављени и саопштени резултати који чине саставни дио докторске дисертације	109
9	Биографија.....	110
10	ИЗЈАВЕ .....	111

# 1 УВОД

Гојазност представља хроничну, комплексну болест која се сматра растућим светским здравственим проблемом. Током протекле четири деценије учесталост гојазности се драматично повећала широм света, што је довело до тога да се гојазност посматра као један од главних узрочника настанка хроничних незаразних обољења у свим старосним групама. Светска Здравствена Организација (СЗО) дефинише гојазност као абнормално или опсежно накупљање масти које може наштетити здрављу појединца (1). Гојазност представља комплексно стање, са озбиљним патофизиолошким, социјалним и психолошким последицама које погађа све старосне и социоекономске групе. Према подацима СЗО из 2016. године, у свету се налази преко 1,9 милијарди одраслих особа прекомерне телесне масе (ТМ) (Индекс телесне масе (ИТМ)  $\geq 25 \text{ kg m}^{-2}$ ), од којих је 650 милиона гојазно (ИТМ  $\geq 30 \text{ kg m}^{-2}$ ) (1). Према извештају СЗО из 2022. године, око 60% европске популације има прекомерну телесну масу или је гојазно, наглашавајући озбиљност овог обољења пандемијских размера. Према последњим проценама, прекомерна телесна маса и гојазност годишње узрокују преко 1,2 милиона смртних случајева у Европи, заузимајући четврто место водећих узрочника смртности услед узроковања више од 13% свих смртних случајева. Са повећањем ИТМ значајно се повећава и ризик од оболевања од других метаболичких и кардиоваскуларних обољења (Табела 1). Сматра се да је пандемија коронавирусне болести (енгл. *Coronavirus disease, COVID-19*) значајно допринела споменутој статистици услед смањене физичке активности и повећаног уноса хране богате мастима и шећерима (2).

**Табела 1.** Вредности ИТМ и обима струка, ризик оболевања од других болести код особа са прекомерном телесном масом и гојазних особа, према СЗО (3)

Класификација	Индекс телесне масе ( $\text{kg m}^{-2}$ )	Ризик од оболевања (у зависности од ТМ и обима струка)	
		Мушкарци < 102 cm	Мушкарци > 102 cm
Бела раса		Жене < 88 cm	Жене > 88 cm
Потхрањеност	< 18,5	веома висок	-
Нормална ТМ	18,5 – 24,9	-	висок
Прекомерна ТМ	25,0 – 29,9	повишен	висок
Гојазност тип I	30,0 – 34,9	висок	веома висок
Гојазност тип II	35,0 – 39,9	веома висок	веома висок
Гојазност тип III	$\geq 40,0$	екстремно висок	екстремно висок
Популација Јужне Азије, Кине и Јапана		Мушкарци < 90 cm	Мушкарци > 90 cm
		Жене < 80 cm	Жене > 80 cm
Потхрањеност	< 18,5	низак	просечан
Нормална ТМ	18,5 – 22,9	просечан	повишен
Прекомерна ТМ	23,0 – 24,9	повишен	умерен
Гојазност тип I	25,0 – 29,9	умерен	висок
Гојазност тип II	$\geq 30,0$	висок	веома висок

Прекомерно накупљање масног ткива, посебно у пределу абдомена (висцерална гојазност), представља озбиљан ризик по здравље појединца. Индекс телесне масе ( $\text{kg m}^{-2}$ ), који се дефинише као телесна маса (kg) подељена са квадратом висине ( $\text{m}^2$ ), се користи као најчешћи индикатор прекомерне телесне масе јер се сматра да не захтева посебне вештине особе која мери, као ни скупу опрему приликом извођења мерења (Табела 1). За особе

прекомерне телесне масе вредности ИТМ износе од 25,0 до 29,9 kg m<sup>-2</sup>, док се особе са вредностима ИТМ већим од 30 kg m<sup>-2</sup> сматрају гојазним. Поред ИТМ, како би се се боље проценило абдоминално накупљање масти, веома често се користи и параметар који представља струк-кук однос (енгл. *waist-hip ratio, WHR*). Уколико су вредности *WHR* код мушкараца > 0,90 а код жена > 0,85 сматра се да те особе због абдоминалног накупљања масног ткива имају већу инциденцу обољења повезаних са гојазношћу. Наиме, позитиван енергетски баланс резултује хипертрофијом адипоцита и ектопичним накупљањем масти који доводи до дисфункције ћелијских органела (стрес митохондрија и ендоплазматског ретикулума), метаболичких обољења (метаболички синдром, МС), као и до кардиоваскуларних обољења, дислипидемије, инсулинске резистенције, *diabetes mellitus* типа 2 (ДМ тип 2) и синдрома полицистичних јајника (енгл. *Polycystic Ovary Syndrome, PCOS*) код жена.

## 1.1 Патофизиологија гојазности

Путем хране се обезбеђује задовољавање енергетских потреба човека, неопходних за раст и развој, одржавање базалног метаболизма, телесне температуре и обављање физичке активности. Како би се одржала константна телесна маса, енергетски унос би требао бити једнак енергетској потрошњи. Међутим, када енергетски унос буде већи од енергетске потрошње, 60 – 80% енергетског вишка бива депоновано у облику масног ткива, док се остатак користи за синтезу гликогена, биосинтезу протеина или се изгуби током термогенезе. Због тога, сматра се да је гојазност резултат прекомерног уноса енергије, те смањене потрошње исте услед физичке неактивности, док код одређеног броја људи генска мутација може бити узрок настанка гојазности (4). Сматра се да су хомеостатски и хедонистички путеви два главна система у контроли уноса хране. Хомеостатски пут контролише унос хране тако што повећава мотивацију за јелом након исцрпљивања енергетских резерви. Насупрот томе, хедонистички пут или пут заснован на награђивању може надјачати хомеостатски пут током периода релативног изобиља енергије, при томе појачавајући жељу за конзумирањем хране (5). Заправо, до појаве гојазности долази када хомеостатски и хедонистички регулаторни системи нису балансирани.

### 1.1.1 Серотонин и допамин

Познато је да одређени неуротрансмитери и хормони имају значајну улогу у регулисању апетита, а самим тим и телесне масе. Анималне и хумане студије су показале да се манипулацијом концентрација серотонина може значајно утицати и на апетит, због чега се серотонин сматра значајним неуротрансмитером хомеостатског пута (6). Наиме, смањена серотонинска сигнализација у хипоталамусу нарушава негативну повратну информацију о унесеној количини енергије путем хране те доприноси прекомерном уносу хране и настанку гојазности (7). Друго могуће објашњење дисбаланса хомеостатског и хедонистичког пута регулације се налази у теорији недостатка награде због смањене допаминергичке сигнализације. Ова хипотеза налаже да због смањене допаминергичке сигнализације, која у нормалним условима преноси награђивачке стимулусе везане за храну, долази до прекомерног уноса укусних намирница изван хомеостатских потреба како би се компензовао недостатак осећаја награде (8).

### 1.1.2 Гастроинтестинални хормони

Гастроинтестинални (ГИ) хормони и пептиди, осим регулације ГИ покрета и дигестивне функције, имају значајну улогу у регулисању процеса метаболизма и уноса хране, тиме доприносећи одржавању енергетског баланса (9). Одређени ГИ хормони, синтетисани због стимулуса глади или излагања унесеним нутријентима, утичу на унос хране

промовишући осећај глади или ситости. Познато је да постоје разлике у циркулишућим нивоима ГИ хормона код гојазних особа у поређењу са особама нормалне ТМ (10).

*Грелин*, једини орексигени или хормон глади, примарно се синтетише у фундусу желуца, а везивањем са грелинске рецепторе у хипоталамусу испољава своје ефекте на метаболичке функције. Његове концентрације расту приликом гладовања, а опадају постпрандијално као одговор на унос хране. Грелин стимулише апетит и сматра се одговорним за дугорочну регулацију енергетског баланса. Концентрације грелина су у негативној корелацији са ИТМ, те су концентрације грелина ниже код гојазних особа у поређењу са особама нормалне ТМ (11).

Анорексигени ГИ хормони, који подразумевају глукагону-сличан пептид 1 (енгл. *Glucagon-Like Peptide 1, GLP1*), пептид YY (*PYY*) и холецистокинин, синтетишу се као одговор на унос хране и утичу на дигестију, секрецију инсулина, метаболизам и доводе до осећаја ситости (9). Код гојазних особа секреција анорексигених хормона након оброка је одложена, редукована или на неки други начин нарушена (12, 13).

*Инсулин* је панкреасни хормон одговоран за одржавање хомеостазе глукозе, чије концентрације расту након оброка како би се вредности глукозе у крви одржале у оквиру нормалних вредности. Концентрације инсулина зависе и од количине масног ткива, при чему је инсулинска осетљивост у негативној корелацији са количином висцералних масти (14). Током периода гладовања и након уноса оброка, концентрације инсулина су значајно више код гојазних особа у поређењу са особама нормалне ТМ (15). Код гојазних особа је присутна инсулинска резистенција, али и смањена централна инсулинска осетљивост, услед чега долази до смањења осетљивости рецептора хипоталамуса на инсулин и последичног повећања апетита (16).

### 1.1.3 Дисфункција адипоцита

Услед већег енергетског уноса наспрам енергетске потрошње долази до прекомерног складиштења енергије у адипоцитима, и то у облику интраћелијског складишта триглицерида. Повишен интраћелијски садржај липида доводи и до пораста величине (хипертрофија) и до пораста броја (хиперплазија) адипоцита. Иако фактори који утичу на процесе хипертрофије и хиперплазије нису до краја разјашњени, сматра се да значајан утицај имају инсулин и глукокортикоидни хормони, у смислу да стимулишу диференцијацију преадипоцита у адипоците (17). Пропорционално са растом величине, ћелије масног ткива појачано продукују и разне пептиде, попут лептина, цитокина интерлеукин-6 (енгл. *Interleukin-6, IL-6*), фактор некрозе тумора  $\alpha$  (енгл. *Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF*), ангиотензиноген, адипсин, метаболите попут слободних масних киселина и лактата, док је продукција антиинфламаторних једињења и адипонектина снижена (18). Наведене промене у метаболизму могу довести до других поремећаја, као што су дислипидемија, хипертензија, хиперинсулинемија и ДМ тип 2.

Додатно, повећана маса масног ткива код гојазних особа, без адекватне васкуларизације, може довести до хипоксије, инфилтрације макрофага и процеса инфламације. Присуство хипоксије у масном ткиву доказана је на анималним моделима, као и код гојазних особа. *In vitro* студије су показале да експериментална хипоксија стимулише секрецију адипокина значајних у процесима инфламације, попут ангиопоетину-сличан протеин 4, лептин, *IL-6*, васкуларни ендотелни фактор раста, итд. Поред тога, уочене су повишена експресија гена транспортера за глукозу 1 (енгл. *Glucose transporter (GLUT) 1 gene*), као и транспорт протеина и глукозе, што указује на то да ниске концентрације  $O_2$  стимулишу употребу глукозе у адипоцитима гојазних индивидуа. Може се рећи да хипоксија услед смањене васкуларизације масног ткива представља потенцијални патогени фактор,

који може узроковати процесе стреса и инфламаторног одговора и довести до дисфункције масног ткива (19).

### 1.1.3.1 Адипокини

*Лептин* је анорексигени хормон који се првенствено синтетише у белом масном ткиву, а чије су концентрације пропорционалне количини масног ткива и представљају меру енергетских резерви организма (20). Лептин регулише метаболизам липида тако што стимулише липолизу а инхибише липогенезу. Пролазећи крвно-мождану баријеру, везује се за рецепторе у хипоталамусу, преноси информације о периферном енергетском статусу, те смањује секрецију апетит-стимулишућих док повећава секрецију анорексигених неуропептида (21). При томе, код особа осетљивих на лептин, лептин доводи до смањеног уноса хране и стимулише потрошњу енергије како би се одржала равнотежа енергетских резерви у организму. Међутим, насупротив очекиваном, код гојазних особа присутне су повишене концентрације лептина узроковане тзв. лептинском резистенцијом, због чега чак и повишене вредности лептина нису ефикасне у супримирању осећаја глади. Сматра се да гојазне особе имају лептинску резистенцију која доводи до прекомерног уноса хране. Лептинска резистенција заправо представља и узрок изостанка ефикасности терапије гојазних особа лептином (11).

*Адипонектин* је протеин који се доминантно синтетише у масном ткиву. За разлику од већине других адипокина, циркулишуће вредности адипонектина негативно корелишу са ИТМ, те су снижене код гојазних особа, особа са *diabetes mellitus* или кардиоваскуларним обољењем. Снижене вредности адипонектина се приписују измењеном хормоналном статусу, заједно са повећаним оксидативним стресом и проинфламаторним стањем присутним код гојазних особа и особа са МС. *AdipoR1* и *AdipoR2* представљају главне рецепторе за адипонектин (22). *AdipoR1* је доминантно изражен у мишићима, док је *AdipoR2* изражен у јетри. Везивањем адипонектина за *AdipoR1* долази до активације АМР-активираних протеин-киназа (енгл. *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK*) путева када долази до инхибиције глуконеогенезе заједно са повећаном оксидацијом масних киселина, док се приликом везивања адипонектина за *AdipoR2* активирају пероксизом пролифератором-активирани рецептор (енгл. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, PPAR*) путеви услед чега такође долази до повећане оксидације масних киселина, али и инхибиције процеса оксидативног стреса и инфламације. Адипонектин редукујући глуконеогенезу у јетри и повећањем транспорта глукозе у мишићима, има значајну улогу у регулацији инсулинске осетљивости периферних ткива. Заправо, повишене вредности адипонектина су повезане са мањом инциденцом настанка гојазности и обољења повезаних са гојазношћу попут *diabetes mellitus* (23). Снижене вредности адипонектина, још у раном животном добу, представљају фактор ризика за настанак атеросклерозе, хипертензије, инсулинске резистенције и *diabetes mellitus* типа 2 (24). Инхибицијом *TNF*-индуковане активације *NF-κB* путева у ендотелним ћелијама, адипонектин испољава и антиинфламаторни ефекат. Адипонектин и *TNF* заправо испољавају реципрочну негативну интеракцију на њихову локалну продукцију у масном ткиву, сугеришући да смањена продукција адипонектина код гојазних особа доводи до погоршања инфламације у масном ткиву, при чему настаје зачарани круг смањене синтезе адипонектина (25).

### 1.1.3.2 Стрес ендоплазматског ретикулума и оксидативни стрес митохондрија

Повећана липидна складишта у адипоцитима могу узроковати промене у функцији ендоплазматичног ретикулума и митохондрија, које су значајне у патофизиологији гојазности. Ендоплазматични ретикулум је ћелијска органела одговорна за формирање масних капљица, синтезу протеина и регулисање синтезе холестерола путем регулације

ослобађања протеина који везују регулаторни елемент стерола (енгл. *Sterol-Regulatory Element Binding Proteins, SREBPs*). У хипертрофираним ћелијама масног ткива, познато је стање стреса ендоплазматичног ретикулума, када је нормално функционисање ове органеле нарушено. Стање стреса ендоплазматичног ретикулума доводи до значајне промене у метаболизму масти и протеина. Стрес ендоплазматичног ретикулума такође доводи и до смањене продукције адипонектина, као и до измењене осетљивости ћелија на деловање инсулина. Друга ћелијска манифестација стреса ендоплазматичног ретикулума јесте „одговор несавијених протеина” (енгл. „*Unfolded Protein Response*”, *UPR*). У цитозолу се, у присуству сувишних нутријената услед прекомерног уноса хране, гомилају абнормално савијени протеини, који надаље могу да утичу на нормално функционисање ћелије. Како би се спречила синтеза и повећало уклањање абнормално савијених протеина ћелије дају одговор који резултује променом регулаторних путева, и то се назива *UPR* одговор. Одговор несавијених протеина надаље, може да подстакне настајање инсулинске резистенције, доприносећи даљем повећању концентрација глукозе, али и стреса ендоплазматичног ретикулума, при чему настаје зачарани круг инсулинске резистенције. У стању стреса ендоплазматичног ретикулума, *c-Jun N*-терминалне киназе (*JNK*) представљају главног интраћелијског медијатора, који се активира услед повећаних концентрација проинфламаторних једињења и слободних масних киселина у ћелијама јетре, мишића и масног ткива. У ћелијама масног ткива, активирани *JNK* се везују и редукује активност супстрата инсулинског рецептора (енгл. *Insulin Receptor Substrate, IRS*), при томе узрокујући смањену инсулинску осетљивост. Фактор некрозе тумора  $\alpha$  инхибира активност инсулина, углавном тако што стимулише фосфорилације серинских остатака *IRS-1* протеина. Фактор некрозе тумора  $\alpha$  овим путем активира *JNK1*, при чему долази до смањене осетљивости ћелија периферног ткива на деловање инсулина и појаве инсулинске резистенције. То заправо значи да стрес ЕР не доводи до инсулинске резистенције само у ћелијама масног ткива, него да присуство *JNK* доводи до инсулинске резистенције и у ткивима јетре, панкреаса и мишића. Сматра се да услед стреса ендоплазматичног ретикулума панкреасних  $\beta$ -ћелија долази до глукотоксичности и липотоксичности, процеса који доводе до апоптозе  $\beta$ -ћелија и нарушене хомеостазе концентрација инсулина и глукозе. Заправо, услед стреса ендоплазматичног ретикулума и повећане активности *JNK* у ћелијама панкреаса, смањена је продукција инсулина као и инсулинска осетљивост  $\beta$ -панкреасних ћелија (17).

Стање гојазности такође може узроковати и оксидативни стрес на нивоу митохондрија. Митохондрије су органеле које заузимају централно место у метаболизму ћелија, јер представљају место активности циклуса трикарбоксилних киселина као и место синтезе *ATP*-а оксидативном фосфорилацијом. У адипоцитима гојазних особа, метаболизмом вишка слободних масних киселина, у митохондријама долази до ослобађања реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species, ROS*) које узрокују настанак оксидативног стреса. Реактивне врсте кисеоника утичући на производњу инсулина у панкреасу могу узроковати апоптозу  $\beta$ -ћелија панкреаса, те довести до погоршања хипергликемије. Хипергликемија, настала инсулинском резистенцијом скелетних мишића, може довести до додатне производње *ROS* у митохондријама, чији хронични вишак у јетри и скелетним мишићима може допринети даљој прогресији резистенције ћелија на деловање инсулина. Такође, проинфламаторни цитокини попут *TNF* могу допринети процесима оксидативног стреса тако што подстичу производњу *ROS* (26).

#### 1.1.4 Медијатори инфламације

Неколико фактора, укључујући хипертрофију адипоцита, хипоксију и оксидативни стрес, могу допринети настанку инфламаторних процеса у масном ткиву. Гојазност и инфламација су повезани процеси значајни у патогенези одређених обољења, попут инсулинске резистенције, дијабетеса, атеросклерозе и неалкохолне болести масне јетре.

Докази да се гојазност може сматрати инфламаторном болешћу произилазе из бројних студија које показују умерено повећање циркулишућих инфламаторних фактора код гојазних пацијената и различитих типова имунских ћелија које инфилтрирају масно ткиво (19). Масно ткиво гојазних особа представља место инфилтрације макрофага, при чему се инфилтрација пропорционално повећава са повећањем масе масног ткива и ИТМ. Макрофаги, који бивају регрутовани као одговор на апоптозу или хипертрофију ћелија масног ткива, групишу се и формирају структуру налик круни приликом чега у потпуности окружују ћелију масног ткива. Инфилтрација масног ткива макрофагима значајно мења ткивно-специфичан метаболизам глукозе и липида, те доводи до промене у производњи цитокина, попут адипонектина и моноцитног хемотактичног протеина 1 (енгл. *Monocyte Chemoattractant Protein 1, MCP1*). Повећана продукција проинфламаторних протеина, *MCP1*, колонија стимулишућих фактора 1 и 3 у масном ткиву доводи до хемоатракције моноцита из циркулације (19). Услед повећане мобилизације и активности имунских ћелија, некрозе адипоцита и поремећаја метаболизма масти, повећана је и продукција проинфламаторних цитокина, што даље погодује настанку инфламаторног стања код гојазних особа (27). Најважнији маркери инфламације код гојазних особа су *IL-6*, *TNF* и Ц-реактивни протеин (енгл. *C-reactive protein, CRP*).

*Фактор некрозе тумора  $\alpha$*  представља маркер инфламације којег производе макрофаги, као и саме ћелије масног ткива. Концентрације *TNF* су повишене код гојазних особа, до чијег снижења долази приликом губитка телесне масе. Везујући се за *TNFR1* рецептор активира *JNK* и нуклеар-фактор - *кВ* (енгл. *Nuclear Factor -  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B*) путеве, приликом чије активације долази до проинфламаторних ефеката карактеристичних за гојазност и инсулинску резистенцију. Крајем прошлог века *Hotamisligil* и сар. су доказали да су вредности *TNF* значајно повишене у плазми и масном ткиву гојазних глодара, те да приликом неутрализације *TNF* код гојазних пацова долази до побољшања преузимања глукозе од стране периферних ткива услед повећане инсулинске осетљивости (28). Овим резултатима је истакнута значајна улога *TNF* у инсулинској резистенцији и дијабетесу који су веома често повезани са гојазношћу. Додатно, повишене концентрације *TNF* присутне су код особа са атеросклерозом, због чега се претпоставља да *TNF* има проатерогени ефекат који испољава повећавајући експресију интрацелуларног адхезионог молекула 1 (енгл. *Intracellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)*), васкуларног ћелијског адхезионог молекула (енгл. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1*), *MCP1*, као и повећано преузимање оксидованих липопротеинских партикула ниске густине (енгл. *Low Density Lipoproteins, LDL*) од стране макрофага (29). Поред стимулишућег ефекта на ослобађање проинфламаторних адипокина, *TNF* пропагира процесе инфламације тако што смањује продукцију антиинфламаторних адипокина, попут адипонектина (30).

*Интерлеукин-6* је медијатор инфламације којег синтетишу ендотелне ћелије, моноцити, адипоцити, приликом чега 15 – 35% циркулишућег *IL-6* потиче из масног ткива. Концентрације *IL-6* су повишене код гојазних особа, те се сматра да има значајну улогу у инсулинској резистенцији и настајању компликација повезаних са њом. Анималне студије су доказале да повећана секреција *IL-6* од стране масног ткива може довести до инсулинске резистенције јетре, и да су концентрације *IL-6* у директној корелацији са концентрацијама *CRP*-а. Висцерално масно ткиво се сматра важним местом секреције *IL-6* и представља потенцијалну повезницу између висцералног масног ткива и инсулинске резистенције, као и између висцералног масног ткива и инфламације с обзиром на то да висцерално масно ткиво може имати значајан утицај на продукцију реактаната акутне фазе од стране јетре (30).

*Ц-реактивни протеин* је циркулишући маркер инфламације који се доминантно производи у јетри као одговор на стимулацију *IL-6*. У акутним инфективним фазама, као и приликом системске инфламације концентрације *CRP* су веома повишене, док је

концентрација *CRP* умерено повишена код хроничних инфламаторних стања, када представља индикатор хроничне инфламације ниског степена. Као што је већ наведено, *CRP* и *IL-6* су повишени код гојазних особа, чије су концентрације у директној корелацији са хипертрофијом адипоцита. Циркулишуће вредности *CRP* су повишене и код особа са МС, али се сматра да вредности *CRP* представљају независан фактор ризика за настанак дијабетеса и кардиоваскуларних обољења (31). Повишене вредности *CRP* уочене су и код гојазне деце, старосне доби 10 и 11 година, због чега се *CRP* сматра раним маркером присуства хроничног обољења (32).

### 1.1.5 Генетски фактори

Излагање савременом начину живота (седентарни начин живота, прекомеран унос масти и простих шећера) не доводи код сваке особе до појаве гојазности, што сугерише на постојање генетских механизма специфичних за одређене индивидуе. Познато је 11 моногенских облика повезаних са гојазношћу. Најпознатије су оне које подразумевају недостатак лептинског и меланокортин-4 рецептора, који су доминантно експримирани у хипоталамусу и имају значајну улогу у одржавању енергетског баланса. Тренутно је најчешћа хетерозиготна мутација гена за меланокортин-4 рецептор, која је присутна код 2 до 5% деце која имају тежи облик гојазности (33). Постоје особе које имају полигенску предиспозицију за гојазност, од којих је најпознатија *FTO (Fat Mass and Obesity-Associated Gene)* генска варијанта. Особе које имају једну или две копије ризичних алела имају скоро два пута већи ризик од развоја гојазности (34).

### 1.1.6 Епигенетика

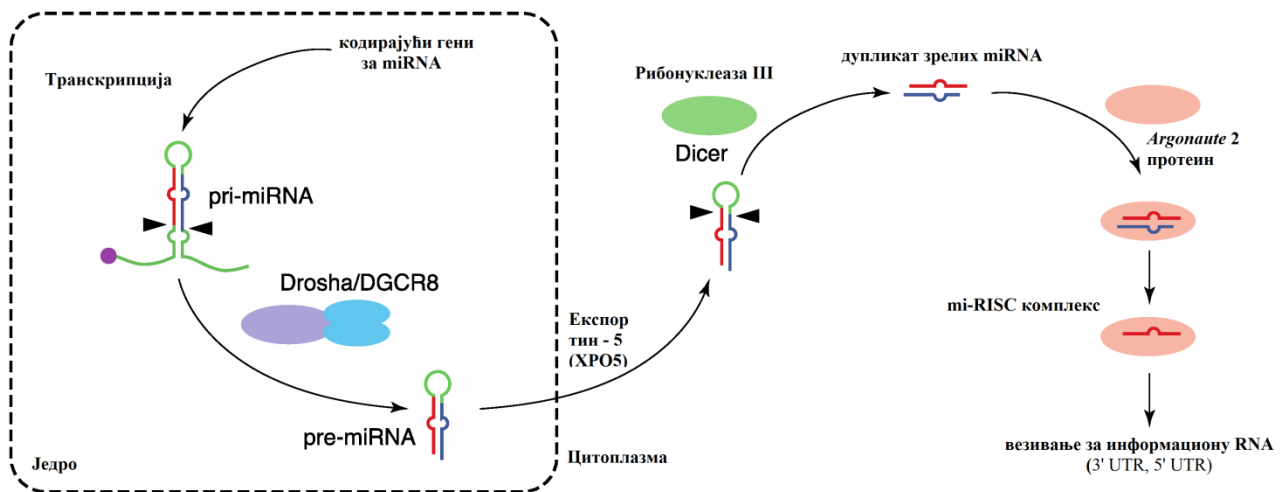
Осим повећаног калоријског уноса, седентарног начина живота, утицаја генетских фактора, постоје докази који указују на то да гојазност може бити последица и епигенетске предиспозиције (35). Епигенетски механизми се дефинишу као ненаследне и реверзибилне појаве које утичу на експресију гена без промене секвенце дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) (36). Епигенетске модификације обухватају метилацију ДНК, модификације некодирајућих рибонуклеинских киселина (РНК) и хистона, те се сматрају важним извором интер-индивидуалних варијабилности које могу допринети настанку стања гојазности. Најчешће испитивана епигенетска промена јесте метилација ДНК, углавном због њене релативне стабилности и лакоће мерења. У већини случајева ДНК је метилирана на 5' позицији цитозинског остатка, посебно на цитозин-фосфат-гуанин динуклеотидима (*CpG*). Промене у метилацији ДНК су динамичне и склоне утицају фактора средине током раног развоја. Исхрана током раног развоја има велики утицај на епигенетске промене, и представља период у коме епигенетске грешке могу имати велике последице по здравље. Међутим, иако мање динамичне, епигенетске модификације се такође дешавају током постнаталног живота и одраслог доба. На пример, краткорочна исхрана богата мастима може довести до промена у метилацији ДНК у људским скелетним мишићима. Поред тога, редовно вежбање доводи до епигенетских промена у скелетним мишићима и масном ткиву особа средњих година, које су пре тога водиле седентаран начин живота (37).

*MicroRNA (miRNA)* представљају мале, некодирајуће РНК са 19 до 25 нуклеотидних база, за које се сматра да играју важну улогу како у процесима експресије гена домаћина, тако и у процесима обликовања ГИ микробиоте (38).

*Биогенеза miRNA*: Примарни транскрипти *miRNA (pri-miRNA)* се транскрибују из геномске ДНК помоћу РНК полимеразе II, када имају структуру сличну укосници (39, 40). У ћелијском једру *pri-miRNA* се обрађује помоћу рибонуклеаза III - типа ендонуклеазом *Drosha-DGCR8* у прекурсорни облик *miRNA (pre-miRNA)*. Након биогенезе у једру, *pre-miRNA* се транспортују у цитоплазму помоћу експортин-5 и обрађују помоћу рибонуклеаза



III *Dicer* у дупликату зрелих *miRNA*. Једна зрела *miRNA* се разграђује, док се друга везује за *Argonaute 2* протеин, формирајући *miRNA*-индуковани утишавајући комплекс (*miRNA-induced silencing complex, miRISC*). Помоћу *miRISC*, у зависности од секвенце смештене на позицији између другог и осмог нуклеотида *miRNA*, *miRNA* се најчешће везују за 3'-нетранслатирани регион (3'-*untranslated region, 3' UTR*) информационе РНК (*messenger RNA, mRNA*). У већини случајева, интеракција између *miRNA* и *mRNA* доводи до инхибиције транслације и/или деградације *mRNA* (41). Познато је да се, поред 3' *UTR*, *miRNA* могу везати за друге регионе *mRNA* као што је промотер секвенце ДНК са индукујућим ефектом на транскрипцију, или кодирајућа секвенца са ефектом утишавања експресије гена (41), као и 5' *UTR* приликом чега може доћи до активације или инхибиције процеса транслације протеина (42). Дакле, због значајне улоге у регулацији многих биолошких процеса, *miRNA* се сматрају важним елементима епигенетске машинерије ћелије (Слика 1).



Слика 1. Биогенеза *miRNA*

Контролом метаболичких путева, *miRNA* су веома важне за одржавање метаболичке и енергетске хомеостазе (43). Циркулишуће *miRNA* могу бити синтетисане од стране различитих ткива, укључујући и масно ткиво, услед чега испољавају различите ефекте на метаболизам удаљених органа (44). Наиме, резултати недавних студија су показали да *miRNA* имају кључну улогу у бројним физиолошким процесима, укључујући процесе пролиферације и апоптозе ћелија, диференцијацију ткива, развој имунског система и имунског одговора, те да постоји значајна корелација између експресије *miRNA* и различитих метаболичких параметара (ИТМ, адипогенеза, гликемија, лептинемиа). Одређене *miRNA* су укључене у регулацију развоја и метаболизма масног ткива, као и у лучење и деловање инсулина, због чега се сматра да њихов дисбаланс може да игра улогу у настанку гојазности и са гојазношћу повезаних метаболичких обољења (45). Подаци из литературе указују и да постоји значајна разлика у експресији одређених *miRNA* у масном ткиву гојазних у поређењу са особама нормалне ТМ, као и да њихова експресија у крви гојазних појединаца значајно корелира са ИТМ, концентрацијама гликозилираног хемоглобина, лептина и глукозе (46). Поред тога, профил циркулишућих *miRNA* код особа са гојазношћу и МС разликује се од профила особа нормалне ТМ (44). Из наведених разлога, *miRNA* се посматрају као обећавајући биомаркери за дијагнозу или прогнозу различитих метаболичких обољења, као и могући нови терапијски приступ за лечење гојазности и сродних болести (44, 45).

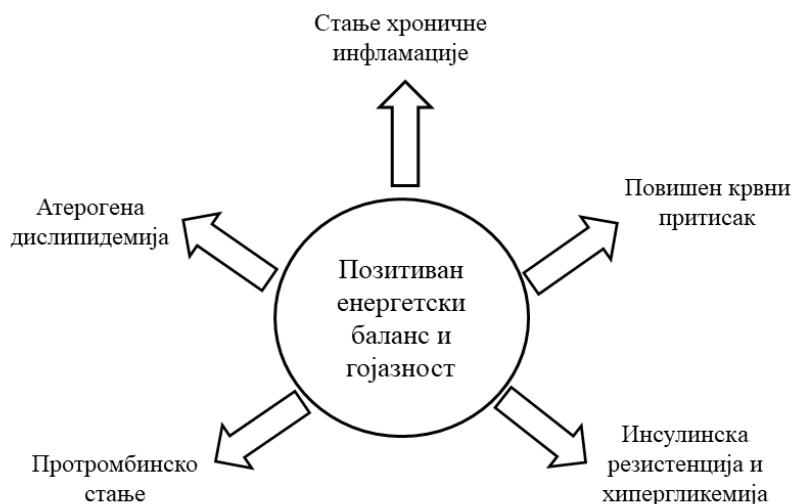
### 1.1.7 Обољења повезана са гојазношћу

Са порастом броја гојазних особа порасла је и инциденца обољења која представљају озбиљан фактор ризика по људско здравље, попут инсулинске резистенције, ДМ тип 2, неалкохолне болести масне јетре, атеросклерозе, МС и одређених карцинома. Гојазни пацијенти такође имају значајно већи ризик од смртног исхода услед тежих компликација *COVID-19* у поређењу са особама нормалне ТМ. Према статистичким подацима, 85% гојазних особа заражених *COVID-19* вирусом је захтевало механичку вентилацију, од којих је 62% завршило са смртним исходом. Узимајући у обзир здравствене компликације које гојазност носи са собом, лечење гојазности је од круцијалног значаја како би се превенирао настанак других метаболичких компликација (47).

*Метаболички синдром* је познат и као синдром инсулинске резистенције, дисметаболички синдром и као синдром „X“. Он је у ствари скуп повезаних поремећаја, који обухватају интолеранцију на глукозу, инсулинску резистенцију, гојазност, дислипидемију и хипертензију (Слика 1). Метаболички синдром представља скуп ризичних фактора, од којих је потребно присуство 3 или више како би се потврдила дијагноза МС, а то су (48):

- снижене концентрације липопотеина високе густине (енгл. *High Density Lipoproteins, HDL*) ( $< 0,9 \text{ mmol/L}$  (35 mg/dl) код мушкараца,  $< 1,0 \text{ mmol/L}$  (40 mg/dl) код жена);
- повишене концентрације триглицерида ( $> 1,7 \text{ mmol/L}$  (150 mg/dl));
- повишен ИТМ ( $> 30 \text{ kg m}^{-2}$ ) и повишен струк-кук однос ( $> 0,9$  (мушкарци) или  $> 0,85$  (жене));
- повишен крвни притисак ( $> 140/90 \text{ mmHg}$ ).

Метаболички синдром је идентификован као фактор ризика за кардиоваскуларна обољења (КВО), те главна сврха дијагностиковања МС јесте да се идентификују људи са високим ризиком од настанка КВО. Такође, МС је повезан и са повећаним ризиком од ДМ тип 2, који заправо и јесте један од главних фактора ризика за настанак КВО. Метаболички фактори ризика за КВО који чине МС не изазивају директно ДМ тип 2, али су веома често удружени са овим обољењем. Већина људи са МС има прекомерну ТМ, те се сматра да је позитивни калоријски дисбаланс основа МС. Међутим одређене особе које имају прекомерну ТМ или су гојазне немају МС, те се сматрају метаболички здравим (49).



Слика 2. Повезаност гојазности и метаболичког синдрома, прилагођено према Grundy (50)

Најшире прихваћена хипотеза која описује основе патофизиологије МС јесте хипотеза која се односи на инсулинску резистенцију, када услед нарушеног процеса липолизе у извесној мери долази до стварања слободних масних киселина у вишку. На почетку процеса,  $\beta$ -ћелије луче повећане количине инсулина као компензациони механизам за одржавање еугликемије. Инсулинска резистенција у скелетним мишићима доводи до смањене синтезе гликогена и транспорта глукозе, док инсулинска резистенција у јетри доводи до смањене ефикасности сигналних путева инсулина. Као последица инсулинске резистенције, већина особа са МС има и повишене нивое глукозе у крви, који могу бити у рангу преддијабетеса или дијабетеса. Акумулација липида у скелетним мишићима повезана је са смањеном фосфорилацијом тирозина, што последично доводи до инхибирања активације фосфатидилинозитол-3-киназе (енгл. *Phosphatidylinositol 3-kinase*, *PI3K*). Иако тачан механизам није потврђен, сматра се да би одређени број серин киназа и инфламаторних интермедијера могли бити одговорни за овај ефекат. Поред тога, повишени нивои *acyl-CoA* или деривата *acyl-CoA* могу смањити активацију протеин-киназе Б (синоним - *Akt*), једног од главних фактора инхибиције липолизе. Сама акумулација липида може бити последица повећане испоруке масних киселина у ткива, где унос енергије надмашује складишне капацитете. Слободне масне киселине углавном потичу из залиха триглицерида у масном ткиву, које се током липолизе ослобађају деловањем цикличног *AMP* (*cAMP*). Током гладовања, овај процес је стимулисан путем катехоламина. Након оброка, овај процес бива инхибиран деловањем инсулина смањењем активности *cAMP*. У условима инсулинске резистенције, када су ефекти инсулина смањени, процеси липолизе ће бити индуковани, што ће резултирати повећаном производњом слободних масних киселина. Вишак слободних масних киселина ће потенцирати негативни циклус инхибиције антилиполитичких својстава инсулина, те довести до даље липолизе (51). Већина особа са МС има атерогену дислипидемију, која се огледа у повећаним концентрацијама липопротеина који у својој структури имају аполипопротеин Б (*LDL*) и липопротеини веома ниске густине (енгл. *Very Low Density Lipoproteins*, *VLDL*) и триглицерида, као и сниженим концентрацијама *HDL*. Повишене циркулишуће вредности *LDL* и *VLDL* узрокују њихову инфилтрацију у артеријски зид, где бивају модификовани низом реакција и инкорпорирани у ћелије макрофага када формирају пенасте ћелије богате липидима. Пенасте ћелије узрокујући низ реакција доводе до формирања фиброзног плака, чија руптура може довести до настанка тромбозе, а последично и до срчаног или možданог инсулта (50).

## 1.2 Терапија гојазности

Иако промене животних навика остају примарна стратегија, веома често се у лечењу гојазности примењују и одређени лекови за редукцију ТМ, али и хируршке интервенције попут гастричног бајпаса. Лекови који доводе до губитка телесне масе углавном делују тако што супримирају апетит или смањују апсорпцију масти из ГИТ-а. Такође, успешном се показала и метода трансплантације фекалне микробиоте здраве особе у ГИТ гојазне особе, указујући на то да манипулација ГИ микробиома представља потенцијални приступ лечења гојазности (52). О значају ГИ микробиоте говори и то да се састав ГИ микробиоте значајно разликује код гојазних особа у поређењу са особама нормалне телесне масе, због чега се примена пробиотика у циљу третмана дисбиозе карактеристичне за гојазне особе сматра оправданом (52).

### 1.2.1 Промене животних навика у третману гојазности

Промене животних навика које имају за циљ смањење енергетског уноса и повећање енергетске потрошње кроз уравнотежену исхрану и повећану физичку активност су суштинска компонента свих програма за губитак ТМ. Дијетарне интервенције се заснивају на принципима редукованог уноса калорија (енергије) како би се створио негативни енергетски

баланс, односно да је енергетска потрошња већа од енергетског уноса. Програми исхране могу довести до губитка ТМ у кратком року, али одржавање ТМ након губитка килограма је често тешко и веома изазовно, те захтева практиковање физичке активности и нискокалоријски дијетарни режим током остатка живота. Физичка активност је саставни и круцијални део сваког програма за губитак ТМ, а посебно приликом одржавања ТМ. Америчко удружење за срце (енгл. *American Heart Association*) препоручује најмање 30 минута умерене физичке активности најмање пет дана у недељи у циљу одржавања здравља (53). Према литературним подацима, физичка активност у комбинацији са дијетарним режимом доводи до већег губитка телесне масе него када је само дијетарна интервенција у питању (54). Дијете са ниским калоријским уносом (800 – 1500 kcal/дан) подразумевају балансиран унос угљикохидрата, протеина и масти у редукованим количинама (55). Нискокалоријске дијете са смањеним уносом масти су веома честе, иако није доказан већи губитак ТМ као ни боље одржавање постигнуте ТМ у поређењу са другим приступима (56). Такође, познато је и да дијета богата засићеним масним киселинама може узроковати дисбиозу гастроинтестиналне микробиоте која је повезана и са хроничном инфламацијом ниског степена код гојазних особа. Нискокалоријска дијета са смањеним уносом угљикохидрата се не користи само за редуцију ТМ него и за редуцију глукозе у крви код особа са ДМ тип 2. Мета-анализа је показала да након 6 месеци долази до већег губитка ТМ наведеном дијетом у поређењу са дијетом смањеног уноса масти (57). Дијете веома ниског калоријског уноса (200 – 800 kcal/дан) се не препоручују за примену, осим у строго контролисаним условима због ризика од дисбаланса електролита, ниског артеријског притиска и повећаног ризика од жучних каменаца (57). Иако су промене животних навика круцијалне у сваком програму губитка тежине, лоша адхеренца и веома изазовно одржавање постигнутих резултата (само 2 – 20% особа успе одржати постигнуте резултате), водили су ка новим истраживањима и примени лекова и нутрацеутика у третману гојазности (58, 59).

### 1.2.2 Фармакотерапија гојазности

Удружење за храну и лекове (енгл. *Food and Drug Association, FDA*) је дозволило примену следећих лекова у терапији хроничне гојазности: орлистат (*Xenical*), бупробион и налтрексон (*Contrave*), лираглутид (*Saxenda*), фентермин и топирамат (*Qsymia*), сетмеланотид (*Imcivree*), семаглутид (*Wegovy*) и тирзепатид (*Zepbound*). Према тренутним *FDA* водичима, фармакотерапија наведеним лековима је оправдана само код пацијената чији је ИТМ  $\geq 30 \text{ kg m}^{-2}$  или  $\geq 27 \text{ kg m}^{-2}$  када је гојазност праћена и неким другим коморбидитетом (60). За разлику од осталих лекова који делују тако што супримирају апетит, орлистат путем инхибиције липазе инхибира апсорпцију масти из хране за 30%. *Contrave* и *Qsymi* супримирају апетит тако што делују на допаминергички систем награђивања. *Contrave* представља комбинацију два лека, бупропиона и налтрексона, који појединачно доводе до мањег губитка килограма него када се користе у комбинацији, када испољавају синергистичко деловање (61). *Qsymia* такође садржи два лека фентермин и топирамат, који у комбинацији супримирају апетит тако што изазивају осећај ситости, што доводи до смањеног преједања и боље комплијансе пацијената (62). Лираглутид и семаглутид су лекови који делују као агонисти *GLP-1* у мозгу услед чега се јавља осећај ситости, долази до губитка килограма, као и концентрације гликозилираног хемоглобина (енгл. *Glycosylated Hemoglobin, HbA1c*) (63, 64). Агонистичким деловањем на меланокортинске рецепторе сетмеланотид регулише апетит, те се примењује само код особа са генском мутацијом која узрокује дефицит про-опиомеланокортина (65). Тирзепатид је најновији лек у терапији гојазности, који има двоструко деловање, тако што делује агонистички на рецепторе глукоза-зависног инсулинотропног пептида и *GLP-1*, доводи до губитка ТМ, посебно у комбинацији са физичком активношћу (66).

Табела 2. Лекови одобрени од стране FDA за лечење гојазности

Генерички и фабрички назив	Механизам деловања	Контраиндикације	Упозорења и нежељене реакције
<b>Агонисти меланокортин-4 рецептора</b>			
Сетмеланотид <i>Imcivree</i> (субкутане инјекције)	Централним деловањем регулише апетити и осећај ситости; убрзава метаболизам у стању мировања.	Није одобрен за било који други облик гојазности осим оног узрокованог дефицитом проопиомеланокортинског 4 рецептора	Хиперпигментација коже, реакција на месту примене, главобоља, мучнина, дијареја, бол у абдомену
<b>Глукагону-сличан пептид 1 (<i>glucagon-like-peptide receptor agonists, GLP-1</i>)</b>			
Лираглутид <i>Saxenda</i> субкутане инјекције	Одлаже пражњење желуца и супримира апетит.	Предиспозиције за медуларни карцином штитне жлезде или мултиплу ендокрину неоплазију тип 2	Тироидни карцином Ц-ћелија, зависно од дозе и дужине терапије. Мучнина, повраћање, дијареја, констипација, бол у абдомену.
Семаглутид <i>Wegovy</i> субкутане инјекције	Одлаже пражњење желуца и супримира апетит.	Трудноћа, предиспозиције за медуларни карцином штитне жлезде или мултиплу ендокрину неоплазију тип 2.	Тироидни карцином Ц-ћелија, зависно од дозе и дужине терапије. Мучнина, повраћање, дијареја, констипација, бол у абдомену, главобоља, диспепсија, вртоглавица.
<b>Инхибитори гастричне и панкреасне липазе</b>			
Орлистат <i>Xenical</i> капсуле	Смањује апсорпцију масти из ГИТ-а.	Трудноћа, синдром малапсорпције, холестаза.	Ризик од хепатотоксичности, холелитијазе, повишеног оксалата у урину, нефролитијазе. Инконтиненција столице узрокована нересорбованим мастима.

Генерички и фабрички назив	Механизам деловања	Контраиндикације	Упозорења и нежељене реакције
<b>Антагинисти опиоидних рецептора/Инхибитори преузимања допамина и норадреналина</b>			
<b>Бупробион и налтрексон</b> <i>Contrave</i> таблете	Смањују жељу за храном и наградом	Хронично узимање опиоида, неконтролисана хипертензија, конвулзивни напади, булимија и анорексија, уколико има мање од 14 дана од узимања МАО инхибитора, одвикавање од алкохола, бензодиазепина, антиепилептика.	Повећан ризик од суицидалних мисли код деце, адолесцената и одраслих млађих од 24 године. Нузеа, повраћање, главобоља, инсомија, суха уста, дијареја.

### 1.3 Гастроинтестинална микробиота

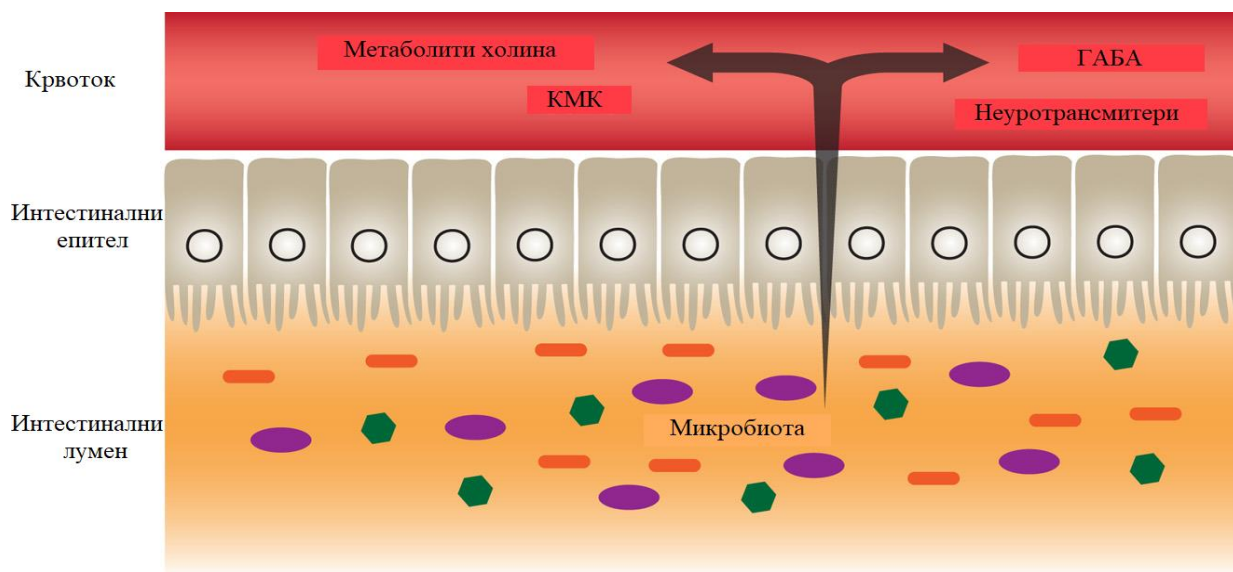
Гастроинтестинална микробиота представља комплексан екосистем бактеријских ћелија које настају гастроинтестинални тракт (ГИТ) домаћина, састављен од отприлике  $10^{14}$  бактеријских ћелија. Црева су колонизована са преко 1000 бактеријских врста, углавном анаеробних, али и аеробних и факултативно анаеробних. Бактерије које настају ГИТ углавном припадају једном од следећих типова: *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Интестинална микробиота поред бактерија садржи и вирусе, архее и протозое. Бактерије које чине саставни део ГИ микробиоте имају значајну улогу у нормалном функционисању ГИТ, али и у одржавању хомеостазе комплетног организма захваљујући протективној, структурној и метаболичкој улози (67).

Многобројне метаболичке функције ГИТ-а подразумевају и синтезу витамина, аминокиселина и биотрансформацију жучних киселина. Биотрансформација жучних киселина се одвија помоћу бактеријских ензима и има значајну улогу у метаболизму холестерола и глукозе. Једна од важнијих улога ГИ микробиоте јесте ферментација недигестибилних једињења када настају краткочланчане масне киселине (*Short Chain Fatty Acids*, *SCFA*) попут бутирата, пропионата и ацетата. Краткочланчане масне киселине углавном настају ферментацијом угљених хидрата, посебно ферментацијом резистентног скроба, али и ферментацијом других дијетних влакана, полидекстрозе и модификоване целулозе (68). Бактеријска ферментација се одвија у цекуму и колону, где *SCFA* бивају и апсорбоване, упоредо доводећи до апсорпције соли и воде приликом чега остварују утицај на интрацелуларни волумен и транспорт јона. Краткочланчане масне киселине имају трофични ефекат на интестинални епител и сматрају се значајним нутријентима интестиналног епитела. Повећана концентрација *SCFA* доводи до снижавања *pH* вредности, што индиректно доводи до редуковања патогених бактерија осетљивих на киселу средину (68). Бутират се сматра значајним извором енергије епителних ћелија колоне где скоро у потпуности бива искориштен, и има значајну улогу у пролиферацији и диференцијацији колоноцита. Ацетат се у мањем обиму метаболише у колону, јер углавном бива апсорбован и транспортован у јетру где се користи као супстрат за синтезу холестерола. Пропионат испољава хиполипемички ефекат захваљујући инхибицији 3-хидрокси-3-метилглутарил-*CoA* (енгл. *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A*, *HMG-CoA*) синтазе и *HMG-CoA* редуктазе што доводи до смањене синтезе холестерола.

Протективна функција ГИ микробиоте се огледа у способности да превенира колонизацију патогених организама и то компетицијом за места везивања и нутријенте, али и продукцијом антимикробних једињења. ГИ микробиота је есенцијална и за нормално функционисање имунског система. Наиме, код стерилних мишева уочен је неразвијен лимфни систем са мањим бројем Пајерових плочица и изолованих лимфоидних фоликула. Додатно, микробиота има значајан утицај на развој Б-ћелија, регулаторних Т-ћелија, Т-помоћних 1 и 2 ћелија, као и Т-17 помоћних ћелија. Имуномодулаторни ефекат бутирата настаје супримирањем активације *NF-κB*, док ацетат испољава овај ефекат деловањем на рецепторе спрегнуте са Г-протеином. Такође, интестинална мукоза активира урођени имунски систем помоћу рецептора за препознавање, попут рецептора сличних толу (енгл. *Toll-like receptors*). Рецептори за препознавање се везују за молекулске обрасце повезане са микроорганизмима (енгл. *Microorganism-Associated Molecular Patterns*, *MAMPs*), као што су:

пептидогликани, липопротеини, липополисахариди, теихојна киселина, флагелини, при чему долази до продукције цитокина и хемокина, те стимулације процеса фагоцитозе. Додатну одбрану од продора бактерија представљају имуноглобулин А антитела (енгл. *Immunoglobulin A, IgA*). Дендритске ћелије својим дендритским наставцима узоркују бактерије са апикалне стране епителних ћелија, презентују и стимулишу продукцију *IgA* од стране Б-лимфоцита ламине проприје. Имуноглобулин А делује тако што задржава бактерије у мукусу, активира систем комплемента или процесе фагоцитозе у случају нарушене баријере и продора микроорганизама. Сходно наведеном, може се закључити да ГИ микробиота има значајну улогу у развоју и хомеостазу имунског система (69).

Гастроинтестинална микробиота има значајан утицај на структуру и функцију ГИТ. Продукцијом *SCFA*, попут бутирата, бактерије ГИ микробиоте ојачавају интестиналну баријеру стимулацијом продукције антимикробних пептида и муцина, као и протеина који улазе у састав „чврстих веза“, приликом чега регулишу њихову пропустљивост. Додатно, ГИ микробиота продукује велики број једињења хормонске природе, која се ослобађају и путем крвотока одлазе до удаљених органа где испољавају свој ефекат, због чега се ГИ микробиота сматра ендокриним органом (Слика 3). За разлику од других ендокриних органа који луче један или евентуално мали број хуморалних агенаса, ГИ микробиота има потенцијал да произведе на стотине једињења. Са морфолошког и биохемијског аспекта, ГИ микробиота представља ендокрини орган који је далеко већи и биохемијски много више хетероген од било ког другог ендокриног органа код човека. Наиме, биохемијска сложеност микробиоте црева чак превазилази и ону у мозгу, а многа једињења које производи ГИ микробиота имају улогу неуротрансмитера у централном нервном систему (ЦНС). На пример,  $\gamma$ -аминобутерна киселина (ГАБА), најважнији инхибиторни трансмитер у мозгу, производи неколико лактобацила (*Levilactobacillus brevis DPC6108* и *Lactocaseibacillus rhamnosus YS9*), док моноаминске неуротрансмитере као што су норадреналин, допамин и серотонин такође производе одређени сојеви бактерија попут *Escherichia coli* К-12 и *Bacillus subtilis* (70).



Слика 3. Гастроинтестинална микробиота као ендокрини орган, прилагођено према Clarke и сарадници (70)



## 1.4 Гастроинтестинална микробиота и гојазност

За разлику од здравих, код гојазних особа уочена је дисбиоза, тј. нарушена равнотежа у саставу микробиоте, промена метаболичке активности и дистрибуције интестиналних бактерија, што даље може бити један од узрока пораста у ТМ, а тиме и развоја гојазности и других метаболичких обољења попут ДМ тип 2, дислипидемија и неалкохолне масне болести јетре (47, 71). Веза између ГИ микробиоте и гојазности установљена је када је уочено да аксенични мишеви нису развили гојазност чак ни након исхране богате мастима и шећерима. Колонизацијом аксеничних мишева са нормалном микробиотом од конвенционалних мишева дошло је до пораста телесне масти за 60%, што је надаље било праћено инсулинском резистенцијом, хипертрофијом адипоцита, повећаним концентрацијама лептина и глукозе. Могуће објашњење за овај ефекат јесте способност микробиоте да доводи до повећане искористљивости енергије из хране, односно да метаболише недигестибилне полисахариде до моносахарида, који се ресорбују и доводе до повећане липогенезе у јетри. Гастроинтестинална микробиота такође супримира експресију инхибитора липопротеинске липазе, што доводи до повећане активности овог ензима, повећане концентрације слободних масних киселина и њихове акумулације у облику триглицерида у адипоцитима (72). Додатно, познато је да се састав ГИ микробиоте гојазних мишева значајно разликује од ГИ микробиоте мршавих мишева. У поређењу са мршавим, код гојазних мишева уочено је за 50% мање присуство бактерија типа *Bacteroidetes* уз пропорционално повећање бактерија типа *Firmicutes*. Једноставније речено, код гојазних мишева је уочен повећан однос *Firmicutes/Bacteroidetes* (*F/B*). Управо овакав састав ГИ микробиоте се сматра „гојазном микробиотом“ и ефикаснијим у искоришћењу енергије из хране, што представља потенцијалну везу између дисбиозе и гојазности (73). Анималне и хумане студије су показале да је гојазни фенотип повезан са већом продукцијом *SCFA* у поређењу са фенотипом нормалне ТМ (74). Уочене разлике у саставу ГИ микробиоте код гојазних и мршавих мишева, потврђене су и хуманим студијама. Наиме, код гојазних особа које су имале већи *F/B* однос у поређењу са особа нормалне ТМ, након губитка ТМ помоћу нискокалоријске дијете тај однос се вратио у нормалу. *Armougom* и *Raoult* такође су учили значајну редукацију типа *Bacteroidetes* код гојазних особа у поређењу са особама нормалне ТМ и особама које су анорексичне (75).

Постоји више механизма који објашњавају улогу ГИ микробиоте у развоју гојазности. Први механизам се односи на повећану енергетску искористљивост због способности микроорганизамана да ферментирају недигестибилне полисахариде из хране (52). Као што је већ описано, ферментацијом недигестибилних полисахарида настају *SCFA*. Процењује се да 10% од укупних дневних енергетских потреба потиче од *SCFA*. Ресорбоване *SCFA* повећавају резерве триглицерида, и то активацијом протеина за везивање елемената који реагује на угљене хидрате (енгл. *Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein, ChREBP*) и транскрипционог фактора 1 који везује регулаторне елементе стерола (енгл. *Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1, SREBF1*), оба кључна у процесима липогенезе.

Поред стимулације процеса липогенезе, ГИ микробиота путем *SCFA* инхибира експресију адипозног фактора индукованог глађу (енгл. *Fasting-Induced Adipocyte Factor – FIAF*) (синоним - ангио-поетину-сличан протеин 4, енгл. *Angiopietin-Like Protein 4*). Синтетисан од стране јетре, црева и масног ткива, *FIAF* инхибира липопротеинску липазу те се сматра значајним регулатором метаболизма липида (76). Повећан унос угљених хидрата и

масти може довести до дисбиозе, уочене код гојазних особа, повећаног складиштења триглицерида у масном ткиву што је повезано са смањеном експресијом *FIAF*. Инхибицијом *FIAF* повећава се активност липопротеинске липазе у адипоцитима, повећаног преузимања слободних масних киселина, увећања депоа масти, а последично и гојазности. Због тога *FIAF* се сматра протективним механизмом настанка гојазности услед прекомерног калоријског уноса.

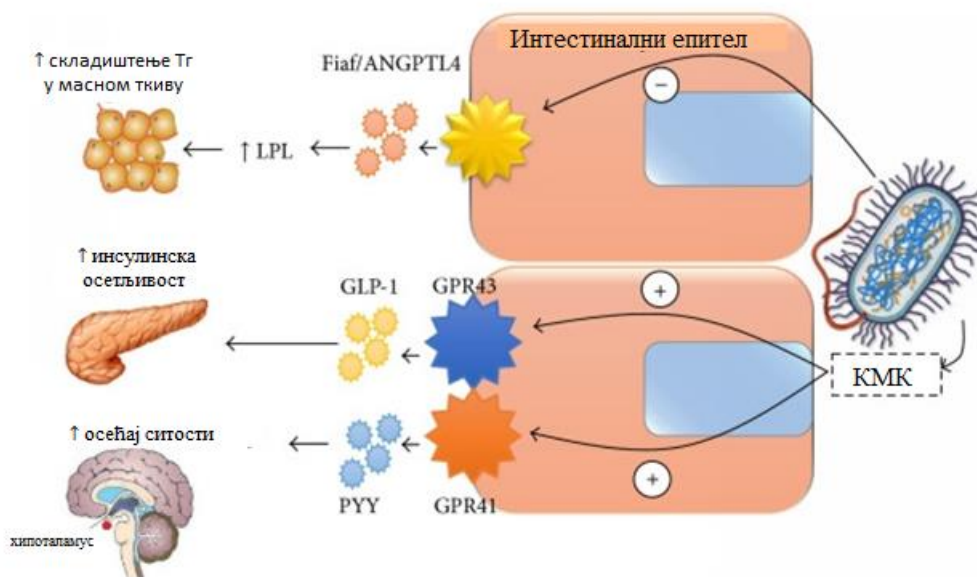
Додатно, ГИ микробиота инхибира активност протеинске киназе активирани аденозин монофосфатом (енгл. *AMP-activated protein kinase, AMPK*), ензима јетре и скелетних мишића значајног за одржавање енергетске хомеостазе. Када је енергетска потрошња ниска, смањена је и активност *AMPK* што узрокује и смањену активност ензима који учествују у процесима  $\beta$ -оксидације, укључујући ацетил-СоА карбоксилазу и карнитин-палмитоил трансферазу, последично доприносећи прекомерном депоновању масти и настанку гојазности (52, 77).

Примарне жучне киселине (холна и хенодеоксихолна киселина) везујући се за фарнезоидни „X“ рецептор (енгл. *Farnesoid X Receptor, FXR*), учествују у регулацији липогенезе у јетри, транспорту липопротеина веома мале густине и триглицерида, али и у одржавању хомеостазе глукозе (78). Везивањем жучних киселина за *FXR* рецептор у илеуму повећава се експресија гена који регулишу апсорпцију, интрацелуларни и системски транспорт жучних киселина у јетру путем ентерохепатичне циркулације. Испитивањем аксеничних мишева са дефицитом *FXR*, доказано је да је експресија гена одговорних за преузимање и транспорт жучних киселина зависна од микробиоте дебелог црева (79). Примарне жучне киселине се захваљујући ГИ микробиоти конвертују у секундарне жучне киселине (деоксихолна и литохолна киселина), везују се за Г-протеински рецептор 5 (енгл. *Takeda G-protein-coupled receptor 5, TGR5*) када стимулишући експресију хормона *GLP-1* учествују у одржавању хомеостазе глукозе и смањују серумске и јетрене концентрације триглицерида. Заправо ГИ микробиота, манипулишући саставом жучних киселина и њиховим везивањем за *FXR* и *TGR5* рецепторе, утиче на концентрације липида у серуму и јетри (80).

Гастроинтестинална микробиота продукцијом *SCFA* може утицати на осећај глади, односно регулисати апетит, а самим тим утицати и на појаву гојазности и пратећих коморбидитета. Концентрација *GLP-1*, протеина значајног у комуникацији између црева и удаљених органа попут јетре, мишића, масног ткива и мозга, након уноса хране расте и доводи до осећаја ситости, регулише перисталтику црева и стимулише секрецију инсулина. Код гојазних особа, секреција *GLP-1* је смањена, што надаље доводи до инсулинске резистенције и инхибиције осећаја ситости (81). ГИ микробиота регулише секрецију *GLP-1* тако што стимулише експресију проглукагона, прекурсора *GLP-1*, као и ентероендокрине Л-ћелије да продукују *GLP-1* (82).

Кратколанчане масне киселине активирају Г-протеинске рецепторе 41 и 43 (*GPR41* и *GPR43*), карактеристичне за епителне ћелије црева, ендокрине ћелије, као и адипоците. Г-протеински рецептор 43 у белом масном ткиву има улогу енергетског сензора, те регулише енергетску потрошњу и учествује у одржавању енергетске хомеостазе. Оба, *GPR41* и *GPR43*, повећавају инсулинску осетљивост и активирају симпатички нервни систем како би се спречило прекомерно депоновање енергије у масном ткиву а повећала енергетска потрошња (Слика 4). Г-протеински рецептор 43 такође стимулише експресију ентероендокриног

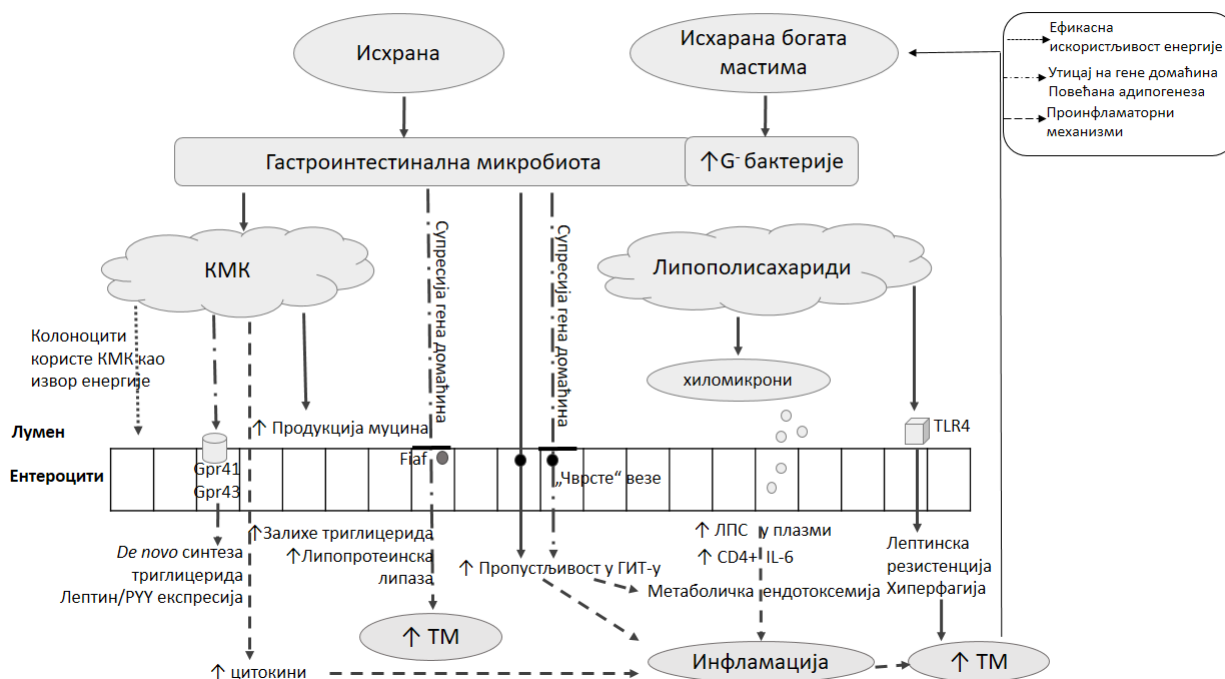
анорексигеног хормона *PYY*, који успорава пражњење желуца, скраћује интестинално транзитно време и смањује апетит (83).



**Слика 4.** Механизам деловања пробиотика на продукцију хормона и апетит, прилагођено према *Khan* и сарадници (84)

Литературни подаци указују на то да промене у саставу ГИ микробиоте код гојазних особа могу нарушити интегритет ГИ баријере, те довести до повећане пропустљивости и смањене експресије протеина који улазе у састав „чврстих веза“.

Услед повећане пропустљивости, бактеријске молекуле попут липополисахарида (ЛПС) Грам-негативних бактерија, пролазе кроз нарушену епителну баријеру, долазе у крвоток и узрокују настанак ендотоксемије (Слика 5). Липополисахариди помоћу молекула за препознавање *CD14* бивају препознати од стране *TLR4* када долази до активације урођеног имунског система. Управо су код гојазних особа које конзумирају дијету богату мастима доказане повишене концентрације ЛПС у плазми и присуство инфламације ниског степена (77). Студије на мишевима указују на то да дијета богата мастима може резултовати променама у саставу ГИ микробиоте и повећаним циркулишућим концентрацијама ендотоксина попут ЛПС (85). Управо се масти из намирница сматрају круцијалним за ресорпцију ЛПС путем хиломикрона (86). Исхрана богата мастима, баш и као сама инфузија ЛПС, код мишева доводи до ендотоксемије, хроничне инфламације ниског степена, веома често праћене неким метаболичким обољењем попут хепатичне инсулинске резистенције (85). Додатно, ЛПС путем *CD14* у масном ткиву стимулишу ослобађање проинфламаторних маркера (*TNF*) и активирају реакције оксидативног стреса (липидна пероксидација) код гојазних особа.



Слика 5. Потенцијална веза између гастроинтестиналне микробиоте и гојазности, прилагођено према *Graham* и сарадници (87)

Још једну повезницу између гојазности и ГИ представља способност *Firmicutes* и *Actinobacteria* да продукују конјуговану линолну киселину (енгл. *Conjugated Linoleic Acid, CLA*) за коју се сматра да делује антиобесигено. Конјугована линолна киселина делује тако што убрзава метаболизам, потрошњу енергетских резерви, стимулише липолизу, те инхибира процесе адипогенезе и липогенезе (88). Студије су показале да *CLA* инхибира *de novo* синтезу липида и да доводи до стимулације процеса апоптозе адипоцита (89). Такође, претпоставља се да *CLA* своје ефекте испољава и истискивањем арахидонске киселине из фосфолипидне ћелијске мембране, при чему је инхибирана синтеза простагландина и леукотријена, проинфламаторних еикозаноида (90). Активирајући одређене факторе транскрипције и *PPAR*, *CLA* утиче и на метаболизам липида, док стимулацијом симпатикуса доводи до повећане енергетске потрошње и смањене адипогенезе (91).

Повезаност ГИ микробиоте и исхране са метаболичким поремећајима је испитивана у бројним анималним студијама. Студије које су укључивале аксеничне мишеве утврдиле су да ГИ микробиота има кључну улогу у регулацији процеса инфламације, имунског одговора и метаболизма (84). Свакако, исхрана се сматра фактором који утиче на састав ГИ микробиоте у смеру повећаног *F/B* односа.

*Ley* и сар. су први пут 2006. године хуманом студијом доказали да је код гојазних особа однос *F/B* већи у поређењу са особама нормалне ТМ (92). Такође, установљено је да одрасле гојазне особе имају значајно више концентрације *SCFA*, односно да је енергетска искористљивост хране много већа код гојазних особа него код особа нормалне ТМ. Хуманим студијама је потврђен и утицај исхране на састав ГИ микробиоте, с обзиром да се количина и састав бактерија мењају у зависности од исхране. Састав ГИ микробиоте се од рођења па до

зрелог доба налази под утицајем многобројних фактора, како познатих тако и непознатих. Велики број интериндивидуалних разлика је уочен у хуманим студијама, сугеришући на значајну интеракцију домаћина и исхране на индивидуалном нивоу (84).

## 1.5 Пробиотици

Иако промене животних навика остају примарна стратегија у лечењу гојазности и пратећих коморбидитета, досадашње студије подржавају идеју да једно од циљних места прецизне исхране у третману гојазности треба бити микробиота, односно примена пробиотика у циљу третмана дисбиозе карактеристичне за гојазне особе (93). Појам прецизне исхране подразумева свеобухватне препоруке за исхрану засноване на индивидуалним варијаблама, укључујући генетику, метаболички профил, здравствени статус, физичку активност, социоекономске и психосоцијалне карактеристике појединца, али и састав ГИ микробиоте домаћина (94).

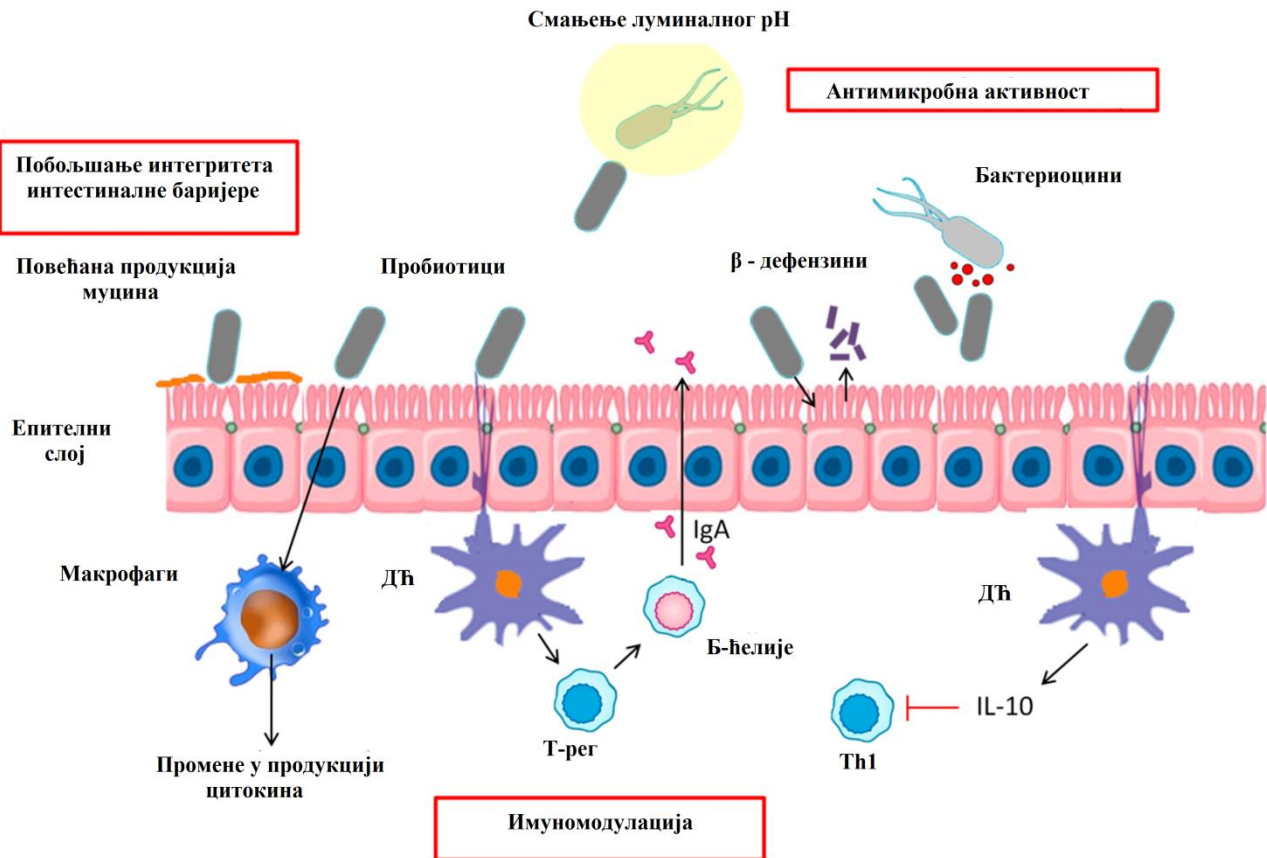
Према концензусу који је усвојен 2011. године од стране СЗО и Организације за храну и пољопривреду (енгл. *Food and Agriculture Organisation, FAO*), пробиотици се дефинишу као живи микроорганизми који, примењени у адекватној количини, позитивно доприносе здрављу појединца (95). Реч пробиотик потиче од две грчке речи „*pro*“ и „*bios*“ што значи „за живот“. Тачан механизам којим пробиотици могу превенирати или имати улогу у третману гојазности није до краја разјашњен, али се промена састава ГИ микробиоте у циљу постизања еубиозе, сматра једним од примарних механизма деловања. Примена пробиотика у третману гојазности се сматра веома интересантном, чак и пожељном, с обзиром да пробиотици веома ретко узрокују нежељене ефекте, те се сматрају безбедним у поређењу са инвазивним методама попут баријатријске операције и лекова који се користе у третману гојазности, а носе са собом многобројне нежељене ефекте који утичу на квалитет живота пацијента.

Илија Мечников (*Elie Metchnikoff*), познати руски зоолог и биолог, је почетком 20. века први уочио позитивне ефекте ферментисаног млека које садржи бактерије млечне киселине (БМК) на дужину живота бугарске популације (96). Након Мечникова, велики допринос науци дао је и *Henri Tissier*, који је након спознаје да се у ГИ микробиоти дојенчади налазе бифидобактерије открио да суплементација са *Bifidobacteria* лечи дијареју код новорођенчади (97). Најчешће спроведене студије подразумевале су пробиотске бактерије које припадају роду *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, а за чије врсте је потврђена сигурност за примену, односно имају статус генерално безбедних (енгл. *GRAS - generally recognized as safe*) за примену код људи.

### 1.5.1 Механизам деловања пробиотика

Пробиотици ступају у интеракцију са домаћином када путем различитих механизма деловања испољавају позитиван ефекат на здравље појединца. Најчешће се ти механизми деловања односе на модификацију састава ГИ микробиоте, ојачавање интестиналне епителне баријере, компетитивну адхеренцију за интестиналну мукозу, продукцију антимикробних једињења и модулацију имунског одговора (Слика 6). Литературни подаци указују да примена одређених пробиотских сојева може довести до редукције ТМ, смањења процента телесне масти, као и обима струка, што се приписује њиховој способности да смање апсорпцију липида (преко хидролизе жучних соли), смање синтезу лептина, повећају термогенезу смеђег адипозног ткива, повећају активност адипозног фактора *FIAF*, али и да

утичу на измену активности у центрима за апетит (синтеза бутирата који повећава осећај ситости или регулација продукције хормона у ГИТ-у одговорних за стварање осећаја ситости) (77, 98-100). Додатно, пробиотици могу имати утицај на епигенетске маркере, као и липидне и инфламаторне параметре повезане са гојазношћу. Повољни ефекати примене пробиотских микрорганизама могу се објаснити и њиховим имуномодулаторним ефектима (100).



Слика 6. Механизам деловања пробиотика у цревима, прилагођено према *Cerdó* и сарадници (52)

Имуномодулаторни ефекат пробиотика се огледа у модулатији локалног (мукозног) и системског имунитета. Модулатија мукозног имунитета подразумева локалну интеракцију са микроорганизмима, продукцију антимикробних пептида, утицај на интегритет „чврстих веза“ и регулацију секреције *IgA*.

### 1.5.1.1 Утицај пробиотика на интегритет интестиналне епителне баријере

Интестинална епителна баријера има важну улогу у очувању хомеостазе једног организма, с обзиром на то да регулише апсорпцију нутријената, али и спречава инвазију патогених бактерија из спољашње средине у крвоток. Интестиналну епителну баријеру чине ИЕЋ, „чврсте везе“ и мукозни слој, као и секретовани антимикробни пептиди, дендритичне ћелије (ДТ), макрофаги и *IgA* антитела. Интестиналне епителне ћелије (ИЕЋ) су повезане међусобно „чврстим везама“, а омогућавају транспорт материја са мукозне ка серозној

страни епитела трансцелуларним или парацелуларним транспортом. Мукозни слој, којег производе специјалне ћелије епитела, веома је важан у спречавању цревних и патогених бактерија да дођу у контакт са ИЕЋ. Због тога, услед нарушеног интегритета интестиналне епителне баријере долази до промена у саставу ГИ микробиоте, измењене ресорпције нутријената, олакшаног проласка патогених микроорганизама у крвоток и настанка системске инфламације. Као последица може доћи до настанка локалних обољења попут инфламаторног обољења црева, целијачне болести и карцинома црева. Међутим, истраживања указују на значајан допринос нарушене интестиналне баријере при настанку системских обољења попут ДМ тип 2 и гојазности (101). Наиме, повећана пропустљивост интестиналне епителне баријере за патогене бактерије и њихове продукте доприноси појави инсулинске резистенције, оксидативног стреса и хроничне инфламације ниског степена, што надаље узрокује развој метаболичких стања повезаних са гојазношћу (52).

Примена пробиотика делујући на дисбиозу, помаже и опоравку нарушене интестиналне епителне баријере модулацијом цитоскелетних протеина и протеина „чврстих веза“, али и стимулацијом продукције мукуса. *In vitro* испитивања показала су да бактерије млечне киселине имају позитиван ефекат на експресију гена протеина који улазе у састав „чврстих веза“, попут Е-кадхерина и Б-катенина (102). Такође, применом *E. coli Nissle 1917* превенирају се негативни ефекти *E. coli* на интегритет мукусног слоја, као и побољшања интегритета Т84 и *Caco-2* ћелија (103). Наведени ефекти се приписују повећаној продукцији протеина *zonula occludens 2 (ZO-2)* и протеин-киназе Ц, који реконструишу комплекс „чврстих веза“. Промовишући секрецију мукуса, пробиотици такође ојачавају интестиналну баријеру и смањују продор патогених микроорганизама. Примена пробиотика *VSL3* (комбинација 8 различитих пробиотских сојева) код пацова, након 7 дана довела је до значајно повећане експресије гена одговорног за продукцију муцина, као и до повећане секреције муцина (104). Такође, ова комбинација пробиотика довела је и до повећане експресије протеина који учествују у изградњи „чврстих веза“ (105).

### 1.5.1.2 Антимикробна и друга једињења продукована од стране пробиотских сојева

Одређени сојеви који припадају *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* родовима имају способност да продукују *CLA*, која има значајне позитивне ефекте за људски организам. На пример, примена *Lactiplantibacillus plantarum* који продукује *CLA* довео је до значајног губитка ТМ код гојазних мишева (106). Друга анимална студија је показала да *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* припадајући сојеви, који продукују *CLA*, модулишу састав слободних масних киселина у јетри и масном ткиву домаћина (107). Поред једињења са позитивним ефектом на здравље домаћина, бактерије млечне киселине продукују и антимикробне пептиде, укључујући и бактериоцине који учествују у елиминацији патогена. Бактериоцини делују тако да стварају поре на циљним ћелијама или инхибишу синтезу ћелијског зида услед чега спречавају раст бактеријских ћелија (108). Други антимикробни пептиди, чије ослобађање стимулишу пробиотски сојеви, називају се дефенсини. Дефенсини делују стабилишуће на интестиналну баријеру, али и антимикробно на патогене бактерије.  $\alpha$ -дефенсини се доминантно секретују у Панетовим ћелијама, а  $\beta$ -дефенсини углавном у епителним ћелијама. Мишеви који су конзумирали *Lactobacillus crispatus* К-11 имали су значајно већу експресију гена одговорних за синтезу  $\alpha$ -дефензина и муцина у поређењу са контролном групом, при чему је остварена заштита и од токсина и од патогених микроорганизама (109). Пробиотски сојеви попут *E. coli Nissle 1917*, *Lactobacillus*

*acidophilus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lacticaseibacillus paracasei subsp. paracasei*, *Pediococcus pentosaceus* и *VSL3* стимулишу експресију гена одговорних за синтезу  $\beta$ -дефенсина 2, значајног за активацију урођеног имунског одговора (110). Додатно, *Saccharomyces boulardii* антимикуробни ефекат испољава тако што продукује ензиме попут серин-протеазе и фосфатазе, помоћу којих доводи до разарања токсина произведених од стране патогених бактерија *Clostridium difficile* и *E. coli* (111).

Анималне студије су показале да суплементација бактеријама млечне киселине, услед производње млечне киселине, доводи до пада *pH* у лумену дебелог црева што знатно утиче на састав ГИ микробиоте у смеру неповољном за раст и развој патогених микроорганизама (112). Додатно, повећана ферментација угљених хидрата од стране пробиотских сојева, услед које долази до повећане продукције *SCFA*, снижава *pH* вредности у колону, те последично инхибира прекомерни раст *pH*-осетљивих патогена (52).

### 1.5.1.3 Утицај пробиотика на секрецију IgA антитела

Захваљујући способности да се везују за муцин, IgA антитела имају важну улогу у неутрализацији патогена у мукозном слоју. Пробиотски сојеви попут *L. rhamnosus GG*, *Bifidobacterium lactis Bb-12* (113) и *S. boulardii* (114) стимулишу продукцију и секрецију IgA у ГИ мукозном слоју. Наиме, пробиотски сојеви стимулишу експресију *TGF $\beta$* , *IL-10*, као и *IL-6* у епителним ћелијама, који заузврат промовишу сазревање Б-ћелија које продукују IgA (115). Додатно, пробиотици стимулишу експресију полимерних Ig-рецептора на базолатералној површини ИЕЋ подстичући трансцитозу IgA кроз епителне ћелије у лумен црева (116).

### 1.5.1.4 Утицај пробиотика на гликемијске и липидне параметре

Велики број студија се бавио испитивањем утицаја пробиотика на гликемијски и липидни профил гојазних особа. Међутим, сазнања из доступне литературе нису конзистентна. *Qiu* и сар. су урадили мета-анализу 9 рандомизовано контролисаних студија које су испитивале ефекте *Lactobacillus* сојева на гликемијски и липидни статус, а које су уључивале укупно 598 испитаника (117). Резултати су показали да суплементација *Lactobacillus* сојевима регулише концентрације укупног и *LDL*-холестерола код особа са прекомерном ТМ или гојазних особа. Међутим, позитиван ефекат на концентрације *HDL*-холестерола није забележен. Снижавајући ефекат на концентрације глукозе наташте и триглицерида такође је уочен, али само уколико је интервенција трајала  $\geq 12$  недеља. Механизми деловања којим суплементација *Lactobacillus* врстама/сојевима испољава позитивне ефекте на концентрацију глукозе и липидних параметара нису до краја разјашњени, и постоји више хипотеза. Претпоставља се да *Lactobacillus* сојеви редукујући концентрације инфламаторних маркера повишених код дијабетеса, доводе и до побољшања стања овог обољења, као и концентрацију глукозе. Друга хипотеза подразумева позитивне ефекте *Lactobacillus* врста на инсулинску резистенцију које испољава регулишући глукагон-сигналне путеве и састав ГИ микробиоте. Позитиван ефекат на липидни профил *Lactobacillus* сојеви испољавају регулишући метаболизам жучних соли и експресију транспортера липида. Суплементација пробиотицима, посебно сојем *L. plantarum 299v* (118),



може довести до снижавања вредности укупног и *LDL*-холестерола, при чему је ефекат дозно и временски завистан. Наиме, наведени ефекти су постигнути суплементацијом у трајању од 12 недеља, при дози  $\geq 10^{10}$  CFU/дан (117), док је смањење концентрације триглицерида уочено и при нижим дозама *L. plantarum* (119). Сматра се да су наведени повољни ефекти последица продукције SCFA, попут пропионата и бутирата, али и промене састава микробиоте након примене *L. plantarum* пробиотика (119). Додатно, анималне и клиничке студије су потврдиле утицај *S. boulardii* на побољшање липидног профила, који се сматра последицом апсорпције холестерола од стране ћелијског зида ове кваснице, али и утицаја на ГИ микробиоту и продукцију проинфламаторних цитокина (120). Како бисмо појачали хиполипемички ефекат пробиотика, у нашој студији смо користили комбинацију пробиотика и хипохолестеролемијског једињења октакозанола.

### 1.5.1.5 Утицај пробиотика на hormone који регулишу апетит

Глад је стање или сигнал који води ка процесу конзумирања хране. Овај сигнал почиње у стомаку, а стимулисан је од стране вагусног нерва који шаље сигнале у случају недовољног уноса хране, под утицајем грелина или метаболичких стања попут хипогликемије. Насупрот томе, ситост доводи до престанка уноса хране, а завршава се онот тренутка када опадне апсорпција нутријената (121). Под нормалним условима, хипоталамус регулише апетит под утицајем чула укуса, неуралних и хормоналних сигнала који регулишу ослобађање хормона и гастроинтестиналну покретљивост. Код гојазних особа хомеостаза неуроухуморалне сигнализације је нарушена у смеру ка повећаном осећању глади.

Узимајући у обзир да је ГИ микробиота значајан регулатор апетита, као и то да је дисбиоза исте присутна код гојазних особа, примена пробиотика се сматра потенцијалном стратегијом модулације ГИ микробиоте и регулисања апетита.

Концентрације лептина у серуму, због лептинске резистенције карактеристичне за гојазност, су значајно повишене код гојазних особа. *Nabavi* и сар. су утврдили да примена пробиотског јогурта код особа са неалкохолном болешћу јетре статистички значајно снижава концентрације лептина у поређењу са вредностима на почетку студије, док промене концентрација нису биле значајне у поређењу са контролном групом (122). Иако механизам путем којег пробиотици снижавају лептин није до краја разјашњен, сматра се да пробиотици снижавајући енергетски унос редукују масу масног ткива, а самим тим и смањено ослобађање лептина од стране адипоцита. Други апетит-регулишући хормон синтетисан од стране масног ткива јесте анорексигени хормон адипонектин. Повећана експресија адипонектин *mRNA* у масном ткиву гојазних мишева уочена је након администрације *L. rhamnosus GG*, а праћена је и повећаним концентрацијама адипонектина у серуму (123). Међутим, прегледна студија која је анализирала седам клиничких студија довела је до закључка да примена пробиотика не доводи до значајног снижења серумских концентрација лептина и адипонектина код особа са прекомерном ТМ или гојазношћу (124). Другим систематским прегледом литературе, такође је примећено да примена пробиотика или синбиотици не утиче значајно на концентрације лептина и адипонектина код особа са преддијабетесом и ДМ тип 2 (125). Аутори прегледних радова сматрају да коначни закључци

о утицају пробиотика на концентрације лептина и адипонектина не могу бити донесени, с обзиром на различитости коришћених сојева, њихових доза и дужине интервенције.

Грелин је хормон који има орексигени ефекат деловањем на апетит-регулишуће путеве хипоталамуса. Плазма концентрације грелина повезане су са ИТМ, те су снижене код гојазних особа и особа са инсулинском резистенцијом (126). Сматра се да *SCFA*, лактати и различити пробиотски сојеви рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* имају значајан утицај на сигнализацију грелинског рецептора *GHSR-1a* (127). Суплементација комбинацијом пробиотика *VSL3* код гојазних адолесцената није резултовала променама у концентрацијама грелина (128). Међутим, суплементација *Bacillus indicus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* и *B. clausii* је довела до редукције серумских концентрација грелина, али и до снижења концентрација ендотоксина, који су били повишени услед повишене ГИ пермеабилности и присутне дисбиозе (129). Насупрот тим резултатима, студија новијег датума показала је да се код спортиста суплементацијом са *L. paracasei* PS23 долази до бољих перформанси, које су праћене редукцијом инфламаторних маркера и елевацијом концентрација грелина (130). Промена ГИ микробиоте директно утиче на концентрације грелина, међутим модулацијом ГИ микробиоте применом пробиотика долази до различитог ефекта на серумске концентрације грелина, у зависности од врсте и соја примењеног пробиотика (131).

#### 1.5.1.6 Улога пробиотика у регулацији телесне масе

Као што је већ споменуто, ГИ микробиота гојазних особа се карактерише дисбиозом, односно саставом микробиоте која доводи до повећане енергетске искористљивости хране а последично и до повећања ТМ. Због тога, ГИ микробиота се сматра потенцијалним местом деловања у циљу превенције и/или третмана гојазности. Орална примена пробиотика се сматра једним од начина манипулисања ГИ микробиоте који би водио ка редукцији ТМ.

Резултати студија које су испитивале ефекат пробиотика на ИТМ су контроверзни (132). Наиме, пробиотици који припадају роду *Lactobacillus* имају значајан ефекат на ТМ, а да ли ће довести до повећања или губитка значајно ће зависити од соја који се користи у суплементацији. На пример, *Limosilactobacillus reuteri* ATCC сој је повезан са губитком ТМ код мишева, док је *L. reuteri* L6798 повезан са повећањем ТМ. Суплементација новорођенчади сојем *L. rhamnosus* GG довела је до значајног повећања ТМ, док је примена соја *L. rhamnosus* PL60 узроковала губитак ТМ код гојазних мишева. Администрација *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NS12 је узроковала губитак ТМ и смањење величине адипоцита гојазних пацова, док је код перади примена *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* NIAIB6 довела до повећања ТМ. *Lee* и сар. су дошли до закључка да примена *L. plantarum* PL62 *trans-10-cis-12-CLA* продукујућег соја доводи до губитка масе адипозног ткива, редукције ТМ, али и до снижења концентрације глукозе у крви гојазних мишева (106). Примена другог *L. plantarum* соја, *LP14*, значајно је смањила величину адипоцита, са тенденцијом смањења укупне масе масног ткива и концентрације холестерола и лептина у серуму гојазних мишева (133).

Систематским прегледом литературе, *Zhang* и сар. су закључили да су значајнији губитак ТМ код гојазних особа пријавиле студије које су за интервенцију користиле више од једног пробиотског соја у поређењу са студијама које су користиле један сој (134). Овај

ефекат се објашњава варијацијом ефеката различитих сојева пробиотика, с обзиром на то да је деловање пробиотика сој-специфично. Аутори су приметили и значајност дужине интервенције, истичући јачи ефекат примене пробиотика на губитак ТМ уколико је интервенција трајала  $\geq 8$  недеља. Још једно значајно откриће ове студије јесте да су пробиотици ефикаснији у редукцији ТМ код особа са прекомерном ТМ и гојазних у поређењу са особама нормалне ТМ. Прегледом доступне литературе може се рећи да је ефекат пробиотика на ТМ сој-специфича, и да значајно зависи од дужине интервенције као и од вредности ИТМ при самом почетку суплементације.

### **1.5.1.7 Антиинфламаторни ефекат пробиотика**

Студије су показале да примена пробиотика, самог или у комбинацији са биоактивним једињењем или редукционом дијетом, има значајан утицај на смањење концентрација *CRP* у крви (135, 136). Постоје подаци који указују да су повишене *CRP* концентрације заправо последица деловања одређених адипоцитокина, посебно *IL-6* који је такође повишен код гојазних особа (137). У поређењу са контролном групом, особе оболеле од ДМ тип 2 које су примењивале комбинацију различитих сојева рода *Lactobacillus*, имале су значајно ниже концентрације *IL-6* (138). Такође, анималне студије потврдиле су ефикасност *Lactobacillus* сојева, али и *S. boulardii* у регулацији *IL-6* концентрација код гојазних пацова и мишева (139-141). Осим промена концентрација *IL-6*, *Núñez* и сар. уочили су снижене концентрације *TNF- $\alpha$*  и *IL-17* код гојазних мишева који су били суплементирани *Lacticaseibacillus casei* (141). Утицај пробиотика на концентрације *IL-17* и *TNF- $\alpha$*  потврђен је и код гојазних особа, где је примена јогурта који садржи одређену комбинацију пробиотика довела до смањења концентрација *IL-17* у периферним моноклеарним ћелијама (142), док је примена пробиотика у комбинацији са редукционом дијетом довела до смањења концентрација *TNF- $\alpha$*  у крви (136).

### 1.5.1.8 Утицај пробиотика на системски имунитет

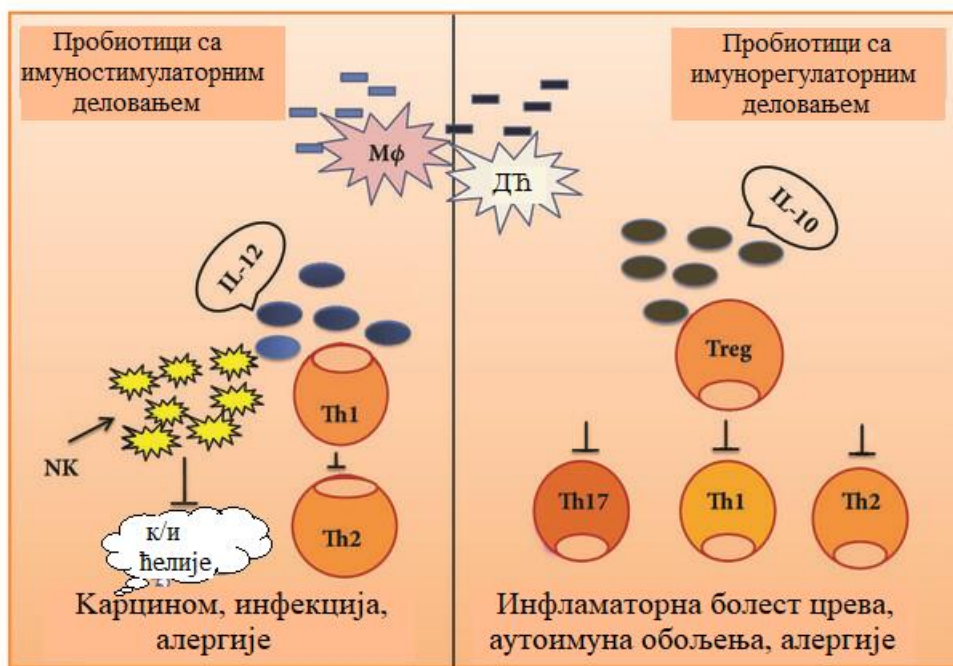
Урођени и стечени имунитет представљају два међусобно зависна дела имунског система. На нивоу ГИ мукозе, урођени имунски одговор представља прву линију одбране против патогених организама, а по потреби биолошком сигнализацијом доводи и до активације стеченог имунског одговора. Патогене и пробиотске бактерије могу довести до мукозног имунског одговора. Главне ћелије урођеног имунског одговора су макрофаги и дендритске ћелије, које су специјализоване за процес фагоцитозе (143).

Интестинални епител, поред улоге физичке баријере, има улогу у узроковању и преносу информација о цревном садржају ка имунским ћелијама смештеним у лимфоидном ткиву повезаном са цревима (енгл. *Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT*). Лимфоидно ткиво повезано са цревима представља највеће лимфоидно ткиво у организму, а подразумева уређена лимфоидна ткива попут мезентеричних лимфоидних нодуса, Пајерових плоча, изолованих лимфоидних фоликула, али и дифузне имунске структуре смештене у епителу ГИТ-а и ламини проприји. Процеси узорковања и презентовања антигена од стране антиген-презентујућих ћелија (АПЋ) имунским ћелијама диктирају даљи смер имунског одговора, тј. да ли ће одговор ићи у смеру супресије или активације. АПЋ подразумевају ИЕЋ, дендритске ћелије и специјализоване „М“ ћелије смештене у Пајеровим плочама (144).

Како патогене, тако и пробиотске бактерије поседују *MAMPs* помоћу којих бивају препознате од стране рецептора за препознавање образаца (енгл. *Pathogen Recognition Receptors, PRRs*) попут *TLR* смештених на површини АПЋ (ДЋ и макрофаги). Молекулски обрасци су специфични за одређени бактеријски сој, и то у погледу полимерне структуре, дужине у врсте молекуласког обрасца. Везивање *MAMPs* за *PRRs* на ИЕЋ и ћелијама *GALT* долази до каскадног низа реакција које доводе до ослобађања цитокина, који одређују природу имунског одговора, односно могу испољити антиинфламаторни (*IL-10, TGF- $\beta$* ) или проинфламаторни (*TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-15*) ефекат (145). Дендритске ћелије се сматрају главним посредником комуникације између ГИ микробиоте, урођеног и стеченог имунитета. Директно помоћу трансепителних наставака или индиректно путем „М“ ћелија, ДЋ врше узорковање коменсалних и патогених бактерија из лумена црева, затим презентују антигене наивним имунским ћелијама и доводе до њихове активације. Мезентерични лимфоидни нодуси се сматрају главним местом иницијације системског одговора, на који значајно утичу врста и концентрација пробиотског соја (146).

### 1.5.1.9 Утицај пробиотика на урођени имунитет

Имуномодулаторни ефекат пробиотика се приписује њиховој способности да утичу на ослобађање интерлеукина, интерферона, *TNF, TGF* и хемокина од стране имунских ћелија (ИЕЋ, дендритске ћелије, макрофаги) који даље регулишу одговор урођеног и стеченог имунског система. У зависности од тога у ком смеру ће ићи имунски одговор, пробиотици се могу поделити на имуностимулаторне и на имунорегулаторне. Имуностимулаторни пробиотици имају способност да помажу у борби против инфективних или канцерогених ћелија, тако што стимулишу продукцију *IL-12*. *IL-12* активира *NK* ћелије које надаље стимулишу *Th1*-одговор. Са друге стране имунорегулаторни пробиотици се повезују са повећаном продукцијом антиинфламаторног *IL-10* и Т-регулаторних ћелија, доводећи до смањене алергијске реакције, смањеног аутоимунског и инфламаторног одговора (Слика 7) (147).



Слика 7. Механизам имунорегулаторног деловања пробиотика, прилагођено према Azad и сарадници (147)

*In vitro* студије су показале да нпр. *Lactobacillus sakei* стимулише продукцију проинфламаторних цитокина, док *Lactobacillus johnsonii* подстиче продукцију антиинфламаторног  $TGF-\beta$ . Borrueel и сар. су испитивали утицај *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. crispatus* и *E. coli* на способност модулисања продукције цитокина на ћелијама интестиналне мукозе пацијената обољелих од Кроневог болести (148). Аутори су установили да су *L. casei* и *L. bulgaricus* испољили антиинфламаторни ефекат услед смањене продукције проинфламаторног  $TNF$ . Имуномодулаторни ефекат *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* сојева је потврђен на пацовима, када је примена ових пробиотских сојева довела до повећане продукције  $IL-10$ , а смањене продукције  $TNF$  и  $IL-6$  (149).

Један од механизма деловања пробиотика на урођени имунитет би се могао објаснити на основу хипотезе да је предиспозиција за развој Кроневог болести повезана са дефектима урођеног имунског одговора. Наиме, доказано је да примена *VSL3* комбинације пробиотика индукује ослобађање  $NF-\kappa B$  из једра епителних ћелија, што је праћено повећаним ослобађањем  $TNF$  и смањеном пропустљивошћу интестиналне епителне баријере код мишева са илеитисом сличним Кроневој болести (150). Сазнања из ове студије су веома значајна с обзиром на то да  $TNF$  стимулише пролиферацију епителних ћелија, те се сматра да пробиотици учествују у регенерацији интестиналне епителне баријере и стимулацијом продукције  $TNF$  (151). Установљено је да *L. casei* интерреагује са епителним ћелијама помоћу  $TLR-2$ , при чему стимулише продукцију  $IL-6$ . Galdeano и Perdigon, један од аутора претходне студије, одлучили су да након администрације *L. casei* испитају и експресију  $TLR-2$  и  $CD-206$  (маноза-специфични рецептор) на дендритским ћелијама и макрофагима изолованих из Пајерових плоча и ламине проприје танког црева (143). Уочен је повећан број

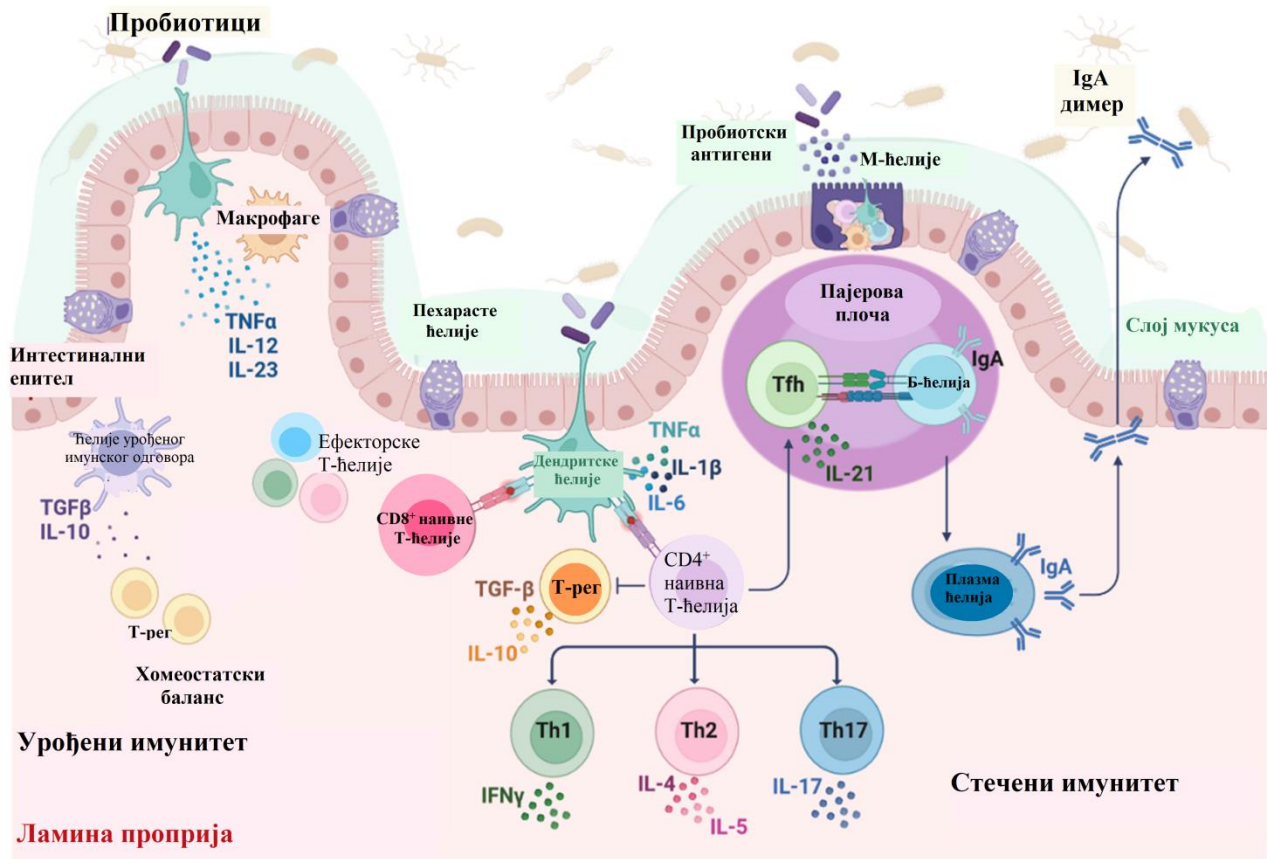
ћелија позитивних на *CD-206* рецептор излованих како из Пајерових плоча, тако и из ламине проприје. Претпоставља се да овај рецептор, сам или у сарадњи са другим рецепторима, може утицати на активацију ДТ и макрофага. Овај рецептор олакшава преузимање антигена који садрже манозу од стране ДТ и њихово презентовање Т-ћелијама, при чему утичу на одговор стеченог имунитета посредован *Th1* ћелијама. Такође, уочена је и повећана експресија *TLR-2* рецептора на испитиваним ћелијама након администрације *L. casei*, што указује на способност пробиотика да стимулишу урођени имунски одговор у ГИТ. *L. casei* и *L. paracasei* повећавајући експресију *TLR-2* и *TLR-4* рецептора утичу на активност макрофага, тиме побољшавајући фагоцитну активност ових ћелија, у зависности од њихове локализације (152). Макрофаги представљају важне ћелије урођеног имунитета, до чије активације долази утицајем многих фактора. Активирани макрофаги се у зависности од функције деле у две категорије: М1 макрофаги који су углавном активирани у току проинфламаторног одговора, док су М2 макрофаги углавном умешани у антиинфламаторне одговоре (153). Код гојазних особа уочен је пораст М1 макрофага у адипозном ткиву, који позитивно корелира са инфламаторним процесима адипозног ткива и инсулинском резистенцијом. Насупрот гојазним, код особа нормалне ТМ доминирају макрофаги М2 популације, који секретују антиинфламаторне цитокине и учествују у одржавању хомеостазе масног ткива (154). Познато је да адипоцити услед гојазности продукују проинфламаторне цитокине попут *TNF* и *IL-6*, али и ЦЦ-лиганда хемокина 2 (енгл. *CC chemokine ligand 2*, *CCL2*) познатог као хемоатрактантни протеин моноцита. Услед хемоатракције, моноцити инфилтрирају у масно ткиво где се диференцирају у активирани макрофаге М1 популације. М1 макрофаги такође продукују *TNF*, *IL-6* и *CCL2*, када настаје зачарани круг инфламаторног стања које погодује настанку инсулинске резистенције и ДМ тип 2 повезаних са гојазношћу (155). Конзумирање *Lactobacillus gasseri* SBT2055 супримира инфилтрацију проинфламаторних М1 макрофага, као и експресију *CCL2* у масном ткиву гојазних мишева. Поред смањене инфламације, уочене су и ниже концентрације глукозе у крви, сугеришући да је након примене пробиотика дошло до побољшања инсулинске осетљивости периферних ткива (155). Такође, уочено је да третман *L. brevis* G-101 или *L. plantarum* CLP-0611 доводи до побољшања стања код мишева са колитисом захваљујући поларизацији М1 у М2 популацију макрофага (156).

#### 1.5.1.10 Утицај пробиотика на стечени имунитет

Стечени имунитет укључује Т- и Б-ћелије, заједно са њиховим продукованим антителима, цитокинима и хемокинима (157). Пробиотске бактерије се помоћу *MAMPs*, специфичних за сваки пробиотски сој, везују за рецепторе за препознавање образаца на АПТ и доводе до њихове активације. Надаље, АПТ на својој површини имају антиген-презентујуће молекуле попут главног комплекса хистокомпатибилности (енгл. *Major Histocompatibility Complex*, *MHC*) које интерреагују са Т-ћелијским рецепторима *CD4* и *CD8* истоимених Т-ћелија. Интеракција ДТ помоћу *MHC II* комплекса са наивним *CD4+* ћелијама може довести до диференцијације *CD4+* у различите подтипове *Th* ћелија, од чега ће и зависити смер имунског одговора. Једноставније речено, пробиотске бактерије путем дендритских ћелија које продукују одређене цитокине доводе до матурације *Th1*, *Th2*, *Th17* или Т регулаторних (Т-рег) ћелија (Слика 8).

Пробиотици најчешће стимулишу продукцију регулаторних цитокина (*TGF-β*, *IL-10*) који активирају Трег ћелије које имају улогу у одржавању хомеостазе интестиналне мукозе.

Познато је 5 врста Трег ћелија: природне  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Трег ћелије (енгл. *natural Treg*, *nTreg*), индуковане  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Трег ћелије (*iTreg*), *Tr1* ћелије, *Th3* ћелије и  $CD8^+$  Трег ћелије.  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Трег ћелије се сматрају најзначајнијим, где *FoxP3* представља транскрипциони фактор значајан за ефикасност Трег ћелија. Трег ћелије ефикасно супримирају имунски одговор и играју значајну улогу у лимитацији имунског одговора. Цитокини попут *TNF*, *IFN- $\gamma$* , *IL-12* и *IL-2* фаворизују *Th1*, док *IL-4*, *IL-5*, *IL-6* и *IL-13* подстичу *Th2* одговор. Промовисањем *Th1* одговора активира се целуларни имунски одговори, тј. процеси фагоцитозе и цитотоксична елиминација патогена. *Th2* одговор промовише хуморални имунски одговор који подразумева ослобађање антитела против екстраћелијских патогена. *Th17* одговор се карактерише продукцијом *IL-17*. Као што је већ споменуто, пробиотици индукују сазревање Б-ћелија у *IgA* продукујуће плазма ћелије. *IgA* има важну улогу у везивању/неутрализацији патогена/токсина са којима дође у контакт на површини интестиналне епителне баријере (158).



Слика 8. Утицај пробиотика на стечени и урођени имунски одговор, прилагођено према Mazziota и сарадници (158)

Истраживања су показала да Т- и Б-ћелије имају значајну улогу у прогресији гојазности, с обзиром на то да је поред макрофага примећено и њихово присуство у структури која наликује на круну, а која окружује некротичне адипоците. Анималне студије су потврдиле улогу  $CD4^+$  *Th1* ћелија у настанку гојазношћу индуковане инсулинске резистенције. Концентрације  $CD3^+$  и  $CD4^+$  ћелија које продукују *IFN- $\gamma$*  су значајно повишене

код гојазних особа. Потпуно уклањање *IFN- $\gamma$*  из тела гојазних мишева је довело до значајног побољшања гојазношћу индуковане инсулинске резистенције као и до смањене инфилтрације масног ткива макрофагима. Хумане студије су потврдиле сазнања из анималних, а то је да фреквенца *Th2* ћелија у масном ткиву и крви негативно корелира са инсулинском резистенцијом, као и са плазма концентрацијама *CRP* (159). Супротно томе, *Th1* ћелије масног ткива показују позитивну корелацију са плазма концентрацијама *CRP*. Повишена концентрација *IL-17* показује позитивну корелацију са инсулинском резистенцијом, и сматра се значајним индикатором озбиљности дијабетеса. Гојазност се карактерише и порастом концентрације цитотоксичних *CD8<sup>+</sup>* Т-ћелија у масном ткиву, где имају значајну улогу у иницијацији инфламаторних процеса масног ткива, а вероватно и у модулатији инсулинске осетљивости. Концентрације регулаторних Т-ћелија, које супримирају имунски одговор и делују антиинфламаторно, су снижене у стању гојазности. Индукција Трег ћелија код гојазних мишева довела је до значајног побољшања инсулинске осетљивости, смањења броја макрофага, као и експресије *TNF*. Управо као Т-ћелије, и Б-ћелије имају значајан утицај на метаболизам глукозе, испитиван углавном код гојазних мишева. Гојазност доводи до повећане инфилтрације Б-ћелија у висцералном масном ткиву, а посебно *IgG<sup>+</sup>* Б-ћелија. Поред продукције антитела, Б-ћелије могу продуковати цитокине који активирају имунски одговор посредован Т-ћелијама. Анималне студије су доказале да недостатак Б-ћелија значи смањену концентрацију М1 макрофага који продукују *TNF*, док је трансфер Б-ћелија гојазних мишева узроковао појаву инсулинске резистенције (159).

Примена пробиотика код гојазних мишева, довела је до активације имунског система утицајем на ДТ да активирају Т-ћелијски одговор, али и захваљујући способности успостављања еубиозе (160). *Poutahidis* и сар. су открили да *L. reuteri* ATCC инхибира повећање ТМ мишева храњених „брзом храном“ и делује антиинфламаторно захваљујући индукцији *Foxp3<sup>+</sup>* регулаторних Т-ћелија и стимулатији продукције *IL-10* (161). С обзиром на то да је гојазност уско повезана са дијабетесом, а оба ова обољења са стањем хроничне инфламације, значајно је споменути да примена пробиотика супримира *Th17* одговор, тиме превенирајући инфилтрацију панкреаса цитотоксичним *CD8<sup>+</sup>* Т-ћелијама (162).

Примена различитих пробиотских сојева попут *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacterium bifidum*, доприносе супресији имунског одговора код обољења где је он експримиран (инфламаторно обољење црева, атопијски дерматитис, реуматоидни артритис). Имуномодулаторни механизам пробиотских бактерија се приписује стимулатији активности *CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>* Трег ћелија, а супресији *Th1*, *Th2* и *Th17* одговора. Конверзија Т-ћелија у *Foxp3<sup>+</sup>* Трег ћелије је омогућена деловањем *IL-10*, *TGF- $\beta$* , *COX-2* и индоламин-2,3-диоксигеназе продукованих од стране ДТ (163). Пробиотска квасница *S. boulardii* смањила је инфламацију у ГИТ-у мишева оболелих од колитиса (164). Главним механизмом деловања се сматра смањена активност *Th1* ћелија, као и смањена продукција интерферона- $\gamma$  од стране мезентеричних лимфних чворова. *VSL3* пробиотска комбинација такође смањује инфламаторни одговор у ГИТ-у мишева оболелих од колитиса, што се приписује повећаној активности Трег ћелија које продукују антиинфламаторни *TGF- $\beta$*  (165).

#### 1.5.1.11 Утицај пробиотика на хематолошке параметре

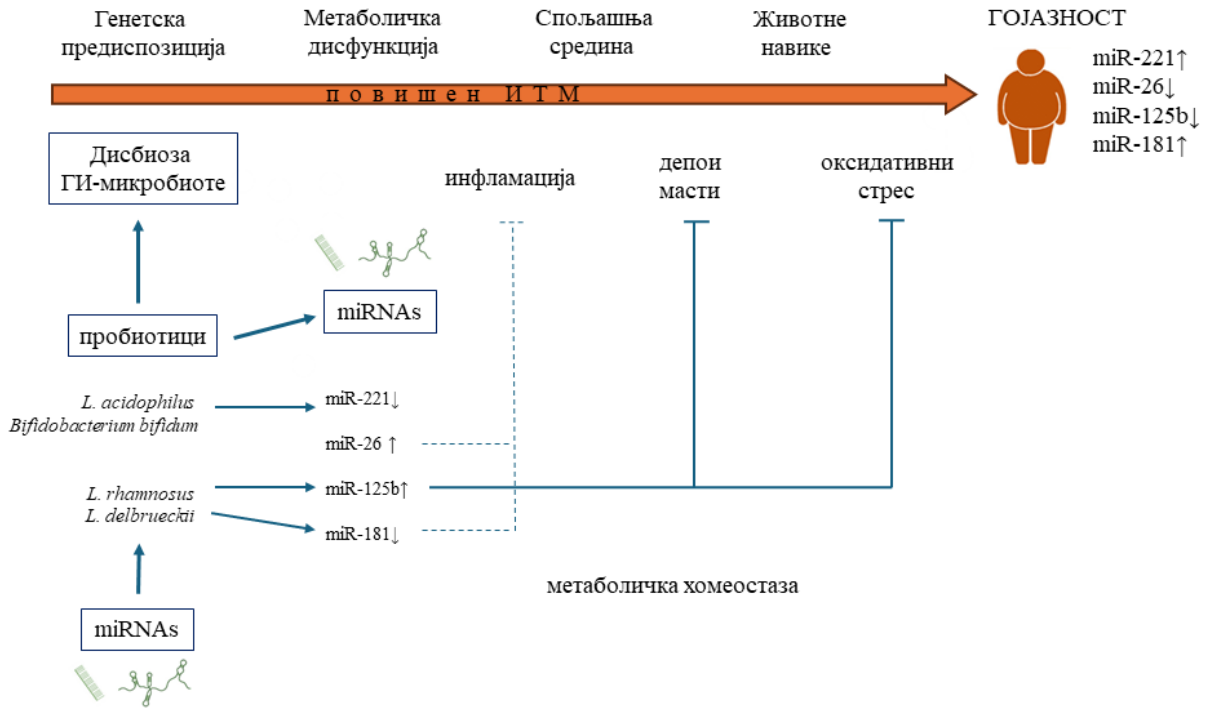
Услед повећаног оксидативног стреса и фактора инфламације, ћелије, а посебно крвне ћелије су подложне структурним и функционалним променама код гојазних особа.



Познато је да су ИТМ и повећана висцерална гојазност повезани са променама хематолошких параметара, попут повећаног броја белих крвних зрнаца, леукоцита (166). Одређене студије описују значајне промене параметара карактеристичних за еритроците и тромбоците (крвне плочице), попут промена у облику, волумену и величини еритроцита (167, 168), повећане агрегације еритроцита (169), промена хематолошких параметара који описују активност тромбоцита, као и повећане вредности фибриногена и П-селектина (170). Додатно, просечни волумен тромбоцита (енгл. *Mean Platelet Volume, MPV*) је повишен код особа са повишеним ИТМ (171). Сматра се да хематолошки параметри представљају потенцијални алат за праћење прогресије гојазности и пратећих коморбидитета (166). Узимајући у обзир повезаност ИТМ са хематолошким параметрима, као и позитивне ефекте пробиотика у третману гојазности, сматрали смо значајним испитати и утицај нове пробиотске формулације на промене хематолошких параметара карактеристичних за еритроците и тромбоците. Додатно, биоактивно једињење коришћено у формулацији наше студије, октакозанол испољава антиагрегацијско деловање (172). Према нашим тренутним сазнањима, у литератури утицај пробиотика на хематолошке параметре до сада није описан.

#### 1.5.1.12 Утицај пробиотика на епигенетске маркере

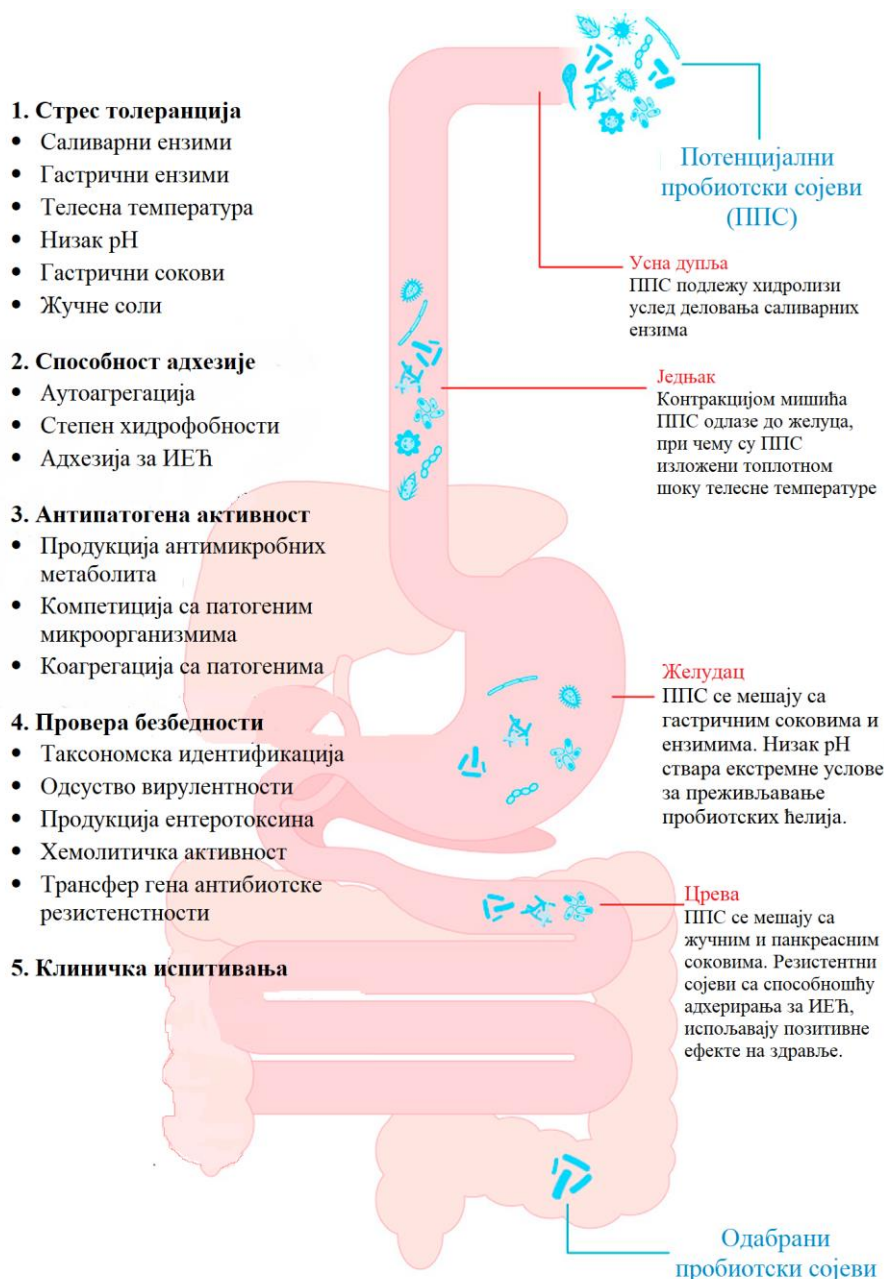
Студије новијег датума указују на то да експресија *miRNA* може бити регулисана дијетом, животним навикама и различитим дијетарним интервенцијама (39, 173). Самим тим унос одређених компоненти из хране може утицати на *miRNA* профил појединца, а последично и на синтезу протеина есенцијалних за биолошке процесе (Слика 9). Додатно, бројне студије указују на то да ендогено синтетисане *miRNA* могу утицати на састав ГИ микробиоте модулацијом експресије гена који утичу на раст микробиоте. Насупрот томе, ГИ може регулисати експресију *miRNA* у ћелијама домаћина, попут интестиналних епителних ћелија када утичу на регулацију интестиналне пермеабилности (174, 175). Механизми деловања пробиотика којим постижу позитиван ефекат на здравље појединца нису до краја разјашњени, али постоје докази да један од механизма управо подразумева *miRNA* молекуле, које се сматрају значајним медијаторима интеракције домаћин-микробиота (38, 176, 177). Примена *B. bifidum* и *L. acidophilus* доводе до смањене експресије *miR-155* код мишева са колоректалним карциномом (178) и *miR-221* код мишева са хепатоцелуларним карциномом (179). Обе *miRNA*, *miR-155* и *miR-221*, имају повишену експресију код гојазних особа. Насупрот томе, експресија *miR-26b* је снижена код гојазних особа. Примена већ поменутих пробиотских сојева такође регулише експресију *miR-26b* у ткиву и серуму мишева са карциномом колона (178). Додатно, администрација *L. delbrueckii* и *L. rhamnosus* доводи до повећане експресије *miR-125a* (180), а смањене експресије *miR-181a* (181) у периферним мононуклеарним крвним ћелијама особа оболелих од лупуса, опет истичући имуномодулаторни ефекат пробиотика.



Слика 9. Деловање пробиотика на експресију *miRNA* код гојазних особа, прилагођено према (177)

### 1.5.2 Критеријуми за карактеризацију пробиотика

Да би се неки сој окарактерисао као пробиотик мора да испуни одговарајуће критеријуме како би испољио одређене бенефите на организам. Сигуран пролаз кроз желудац, као и способност преживљавања и колонизација интестиналног тракта су веома важна својства једног пробиотика с обзиром на велики број фактора којима бива изложен током проласка кроз ГИТ. Пробиотске бактерије морају задржати вијабилност услед интеракције са ГИ соковима различитих *pH* попут желучаног сока и жучних киселина. Након сигурног проласка кроз желудац, пробиотске бактерије морају да омогуће задржавање на месту деловања, и то најчешће адхезијом за ИЕЋ. Што је ћелијски зид бактеријске ћелије хидрофобнији, то је адхезија јача. Пробиотске бактерије рода *Lactobacillus* се управо најчешће везује на овај начин за ИЕЋ (182). Након везивања за ИЕЋ, пробиотске бактерије продукују одређена једињења како би испољиле антимикуробно деловање. Најчешће су то органске киселине, ензими, водоник пероксид и бактериоцини. Поред наведених једињења, антимикуробно деловање бактерија може подразумевати и конкуренцију за нутријенте, коагрегацију са патогенима или стимулацију имуног система. Четврти, али веома важан критеријум за карактеризацију пробиотика јесте његова безбедност за примену. Генерално, пробиотици се сматрају безбедним и имају *GRAS* статус, који се добија након провере вирулентности, токсичности и способности трансфера антибиотске резистенције. На крају, након „*in vitro*“ и анималних студија, последњи корак представљају клиничка испитивања помоћу којих се утврђује безбедност и ефикасност пробиотског соја (Слика 10) (183).



**Слика 10.** Приступ приликом избора пробиотика у складу са *WHO* и *FAO* смерницама, прилагођено према *de Melo Pereira* и сарадници (183)

У Европској Унији сви микроорганизми намењени за конзумирање или производњу намирница морају бити уврштени у листу „Квалификоване претпоставке безбедности“ (енгл. *Qualified Presumption Safety, QPS*), коју издаје „Европска Агенција за безбедност хране“ (енгл. *European Agency of Food Safety, EFSA*). „*QPS*-статус“ потврђује да су одређени микроорганизми безбедни по здравље људи и животиња, те да се могу користити у производњи хране и додатака исхрани (184).

Како би одређени микроорганизам имао „*QPS*-статус“ мора испуњавати следеће критеријуме (185):

- таксономски идентитет мора бити добро дефинисан (на нивоу рода, врсте и соја)
- мора постојати довољан број доказа који потврђују безбедност за примену
- одсуство патогених особина мора бити потврђено и поткрепљено доказима
- намена за примену мора бити тачно дефинисана.

## 1.6 *Lactiplantibacillus plantarum* 299v

*L. plantarum* 299v припада бактеријама млечне киселине, која веома често насељава ГИТ здраве одрасле особе. До 2020. године ова бактерија је имала назив *Lactobacillus plantarum* 299v, када рекласификацијом *Lactobacillus* врста у нове родове добија назив *Lactiplantibacillus plantarum* 299v.

### Механизам деловања

Клиничке студије су потврдиле безбедност примене *L. plantarum* 299v код здравих одраслих особа и деце, као и код особа са различитим обољењима, те ова пробиотска бактерија има *GRAS* статус. Примена *L. plantarum* 299v се показала корисном по здравље појединца, посебно испољавајући бенефите на ГИТ захваљујући побољшању интегритета ГИ баријере, а последично и смањеном локалном и системском инфламацијом.

Захваљујући способности да преживи дуж целог ГИТ и да адхерира на ИЕЋ, *L. plantarum* 299v испољава значајне бенефите код особа са инфламаторним обољењем црева. Наиме, *L. plantarum* 299v се везује за ИЕЋ помоћу адхезина који се налази у ћелијском зиду ове бактерије а који се везује за остатке манозе на површини епителних ћелија. Капацитет везивања за маноза-специфичне остатке варира у зависности од соја, па је тако на пример капацитет *L. plantarum* 299v већи од капацитете *L. plantarum* WCFS1 соја. Поред тога, од великог значаја је и адхезија на мукозни слој како би се обезбедило време за интеракцију бактерије и ИЕЋ. *L. plantarum* 299v адхерира на мукозни слој захваљујући електростатичким и хидрофобним интеракцијама са муцином.

Компетиција за места везивања, продукција *SCFA* које снижавају *pH* у ГИТ-у, стимулација продукције муцина и продукција бактериоцина, представљају неке од предложених механизма деловања пробиотика против патогених организама. Сматра се да је најизраженији механизам деловања *L. plantarum* 299v против патогена управо стимулација продукције муцина, а сматра се кључним механизмом очувања интегритета интестиналне баријере. Као што је већ познато, *L. plantarum* 299v производи млечну киселину, која се сматра прекурсором *SCFA*. Повећана продукција млечне киселине након суплементације *L. plantarum* 299v је праћена и повећаним концентрацијама ацетата и пропионата, код здравих испитаника и код мушкараца са коронарним обољењем.

Анималне студије су показале да *L. plantarum* 299v има антиинфламаторни ефекат (186). Наиме, орална администрација *L. plantarum* 299v код мишева са инфламаторним обољењем црева, узроковала је пад *IFN- $\gamma$*  концентрација у дебелом цреву, те снижење концентрација *IL-12* и имуноглобулина *IgG2a*. Уочен је и благи пад *TNF* код здравих пацова

након суплементације *L. plantarum* 299v. Примена *L. plantarum* 299v код аксеничних мишева доводи до значајног повећања концентрација *IgA* и граничног повећања *IgM* антитела у серуму, указујући на имуномодулаторни ефекат ове пробиотске бактерије. Такође, студија на моделу мишева са ентероколитисом забележила је повећање *IgA* концентрација у танком и дебелом цреву, као и повећан број помоћничких и цитотоксичних Т-ћелија у поређењу са контролном групом. Клиничким студијама потврђен је антиинфламаторни ефекат, када су након суплементације *L. plantarum* 299v смањене концентрације *IL-6* код критично оболелих особа на терапији антибиотцима. Међутим, ефекти на концентрације *IgA* и *IgM* антитела у клиничким студијама нису потврђени.

Истраживања су показала да суплементација *L. plantarum* 299v значајно олакшава тежину и интензитет симптома попут абдоминалног бола, флатуленције и надутости код пацијената са иритабилним синдромом црева. Такође уочен је и напредак у бактеријском диверзитету ГИ микробиоте, као и смањена инциденца дијареје код пацијената са иритабилним синдромом црева који су на терапији антибиотцима. Примена *L. plantarum* 299v испољава позитивне ефекте и на одређене метаболичке параметре, попут постпрандијалног инсулина и липидних параметара. Као што је претходно и споменуто, анималне и клиничке студије су потврдиле потенцијал *L. plantarum* сојева да утичу на редукцију ТМ.

Велики број студија је потврдио да *L. plantarum* 299v различитим механизмима деловања има значајне бенефите по здравље људи, и да представља безбедан вид третмана различитих обољења, посебно обољења ГИТ-а (186).

### **1.7 *Saccharomyces boulardii* (синоним *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*)**

*S. boulardii* је квасница која има карактеристике пробиотика, а разликује се од бактеријских пробиотика по величини, физиологији, као и по томе што не преноси гене везане за антибиотску резистенцију и не подлеже утицају антибиотика. *S. boulardii* испољава значајне бенефите на људски организам, и то захваљујући активности у ГИТ-у и антиинфламаторном деловању. Сматра се безбедном за примену, уз веома ретке појаве фунгемије која има добру реакцију на антимицитике.

У лумену црева *S. boulardii* делује против патогених организама блокирајући рецепторе токсина патогених бактерија, везивањем или директном деструкцијом токсина. Серин-протеаза синтетисана од стране *S. boulardii* директно уништава токсине А и Б патогене бактерије клостридије. Такође, продукцијом фосфатазе долази до деструкције ендотоксина којег производи *E. coli*. Поред деловања на патогене бактерије, *S. boulardii* побољшава интегритет интестиналне епителне баријере тако што ојачава „чврсте везе“ ентероцита. Такође, трофички ефекат у ГИТ-у испољава продукцијом спермина, спермидина и других ензима који помажу сазревање ентероцита.

*S. boulardii* регулише имунски одговор, у смислу повећања концентрације секреторних *IgA* антитела у цревима. Такође, уочене су повећане концентрације серумских *IgG* антитела на *Clostridium difficile* токсине А и Б. Антиинфламаторни ефекат ове кваснице

приписује се способности да стимулише преузимање Т-помоћних ћелија у мезентеричне лимфоидне чворове.

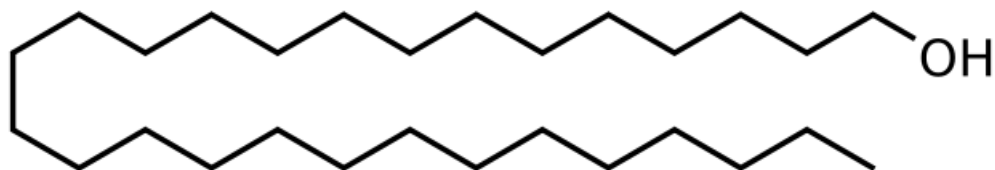
*S. boulardii* испољава позитивне ефекте и сматра се безбедним за примену код многих обољења, са највећом ефикасношћу при дневној дози  $> 10^9$ . Према литературним подацима, дужина интервенције може варирати од 7 дана до 6 месеци (111). Сматра се веома ефикасним у превенцији и терапији дијареја узрокованих применом антибиотика. Такође, постоје докази који потврђују ефикасност у превенцији нежељених ефеката узрокованих терапијом *Helicobacter pylori*, као и у превенцији дијареја повезаних са ентералном исхраном. Резултати клиничких студија указују на обећавајући исход суплементације *S. boulardii* код особа са иритабилним синдромом црева. Овај ефекат се приписује способности кваснице да смањи пропустљивост интестиналне епителне баријере и потенцијалном антиинфламаторном деловању.

Иако су познати позитивни ефекти на здравље ГИТ-а одраслих и деце, потенцијална улога у третману гојазности и метаболичких обољења није до краја разјашњен. Након 4 недеље, примена *S. boulardii* резултовала је значајном редукцијом ТМ и масе адипозног ткива код гојазних мишева. Такође, на моделу гојазних мишева, након суплементације дошло је до смањења тежине јетре, смањења концентрације липида и маркера који указују на инфилтрацију макрофага. Примена *S. boulardii* утиче и на састав ГИ микробиоте, у смеру раста броја *Bacteroidetes*, а смањења броја *Firmicutes* бактерија (187).

## 1.8 Октакозанол

Поликозаноли представљају смешу примарних дуголанчаних засићених алифатичних алкохола (C24-C34) која је најчешће изолована из воска шећерне трске, нерафинисаних биљних уља или житарица целовитог зрна. Октакозанол је главни састојак смеше (C28; ~ 60%), а затим следе триаконтанол (C30; 12–14%) и хексакозанол (C26; 6–12%) (188).

Октакозанол, молекулске формуле  $\text{CH}_3[\text{CH}_2]_{26}\text{CH}_2\text{O}_{14}$ , који се налази у додацима исхрани је најчешће изолован из воска шећерне трске, лат. *Saccharum officinarum* L. Представља једињење добро растворљиво у органским растварачима, док се у води слабо раствара. Управо због липофилног карактера, октакозанол се из ГИТ-а у системску циркулацију ресорбује путем лимфног система, потом одлази до јетре где испољава свој ефекат. Анималне студије су показале ниску биорасположивост октакозанола, када су након оралне примене дозе од 40 mg/kg, концентрације у крви пацова износиле 14–16 ng/mL (189).

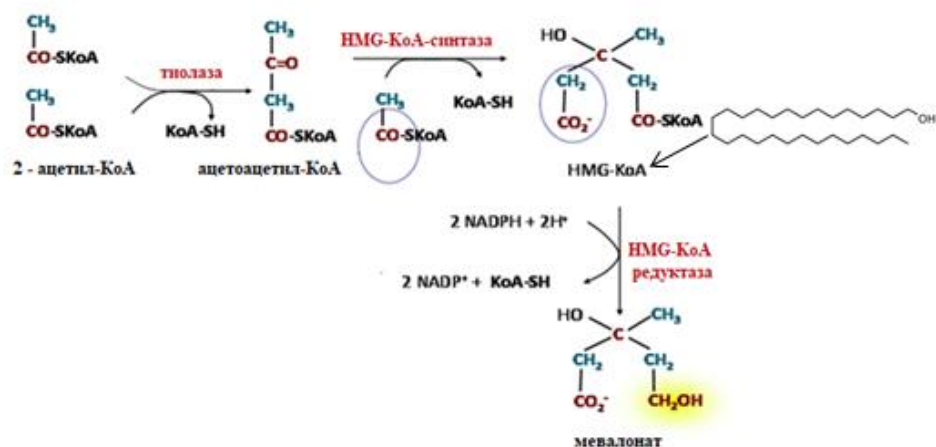


Слика 11. Структура октакозанола

### Механизам деловања октакозанола

Поликозаноли су научницима постали интересантни још 1993. године, када је уочено да орална администрација води до акумулације октакозанола у јетри и масном ткиву, а посебно смеђем масном ткиву (190). Последњих година резултати студија су показали да октакозанол као биолошки активно једињење има потенцијално цитопротективно, хиполипемичко и антиагрегацијско деловање (191). Познато је да поликозаноли у дневној дози од 10 до 20 mg снижавају концентрације укупног и *LDL*-холестерола до 30%, што је еквивалентно ефектима нискодозних статина. Како у краткорочним ( $\leq 12$  недеља), тако и у дугорочним (до 2 године) рандомизованим, плацебо-контролисаним двоструко слепим студијама, поликозаноли су показали хипохолестеролемијски ефекат и код нормо- и код хиперхолестеролемијских испитаника (188). Међутим, код нормохолестеролемијских испитаника утицај поликозанола на *HDL*-холестерол је био минималан, док је код хиперхолестеролемијских пацијената дошло до пораста од 17%. Деловање поликозанола се објашњава тиме да инхибирају синтезу холестерола тако што смањују активност ензима *HMG-CoA* редуктазе активирајући *AMPK* (Слика 12), а могуће је и да повећавају преузимање *LDL* у јетру и разградњу серумског *LDL* (188, 192). Додатно, предложено је да се метаболизам октакозанола, оксидација и деградација до масних киселина, одвија путем  $\beta$ -оксидације, што заправо стимулише конверзију липида у енергију. Суплементација октакозанола у дози од 30 mg/дан код здравих жена резултовала је повећаном синтезом и

екскрецијом жучних киселина, што потврђује интеракцију метаболизма октакозанола и холестерола, с обзиром на то да жучне киселине потичу од холестерола (193).



Слика 12. Механизам деловања поликозанола

Третман октакозанолом код мишева на високомасној дијети смањило је повећање ТМ, превенирао настанак инсулинске резистенције, те утицао на састав масти у јетри. Аутори сматрају да октакозанол утиче на ТМ тако што супримира експресију гена укључених у хепатичну липогенезу, као и оних гена укључених у транспорт холестерола. Уочена је и експресија гена кључних за процесе термогенезе и  $\beta$ -оксидације (енгл. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor: PPAR $\gamma$ 1- $\alpha$ , Free Fatty Acid Receptor 4: FFA-R*) након третмана октакозанолом (194).

Суплементација 40 mg/дан октакозанолом код спортиста на калоријској рестрикцији, узроковала је побољшање липидног профила, у смислу повећаних концентрација HDL-холестерола, а смањених концентрација LDL-холестерола и триглицерида (195). Забележен је и хепатопротективни потенцијал октакозанола захваљујући способности да снизи вредности малондиалдехида, а повећа концентрације антиоксидативног глутатиона (196).

Додатни разлог за комбинацију пробиотика и октакозанола јесте тај што су претходне студије забележиле утицај октакозанола на састав ГИ микробиоте и интегритет ГИ баријере (197, 198). Резултати анималне студије која је укључивала мишеве са улцерозним колитисом указују на то да октакозанол доводи до смањеног односа *F/B* бактерија (197). Такође, уочене су повећане концентрације SCFA и очуваност ГИ епителне баријере, указујући на способност октакозанола да регулише састав ГИ микробиоте и смањи ГИ пропустљивост карактеристичну за улцерозни колитис и друга инфламаторна обољења црева. Друга студија је представила резултате који истичу утицај поликозанола на састав ГИ микробиоте и метаболизам липида код гојазних C57BL/6 мишева (198). Примена поликозанола је довела до смањеног односа *F/B* бактерија код гојазних мишева, смањене активности ензима који



стимулишу синтезу масних киселина, али и до промоције експресије гена значајних за процесе липолизе и термогенезе.

#### *Дозирање и безбедност примене октакозанола*

Поликозаноли се примењују у дневним дозама од 5, 10, 20 и 40 mg. Због недостатка података о томе да ли поликозанол има тератогени ефекат и да ли пролази у хумано млеко, примена се не препоручује током периода трудноће или лактације. Генерално, примена поликозанола се сматра безбедном код одраслих особа. На пример, орална примена поликозанола у дози од 500 mg/kg дневно током 1 године, није узроковала појаву токсичних ефеката. Такође примена 1000 mg поликозанола у једној дози код здравих добровољаца није довела до појаве нежељених ефеката (199). Иако се дугорочна примена поликозанола сматра безбедном, најчешће пријављени нежељени ефекти су губитак ТМ (1,8%), полиурија (0,7%) и главобоља (0,6%). Други могући нежељени ефекти су нервоза, вртоглавица, несаница.

## 2 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Предмет научног истраживања је процена ефикасности комбинације два пробиотска соја, *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (*DSM9843*) и *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*DBVPG6763*), са биолошки активним једињењем октакозанолом у третману гојазности и придружених коморбидитета, а у циљу проналажења новог додатка исхрани који би, уз промене животног стила, био адекватна нутритивна подршка у третману гојазности.

На основу претходно наведених чињеница, истраживања у оквиру докторске дисертације имала су за циљ да испитају утицај два пробиотска соја и октакозанола код гојазних испитаница у репродуктивном периоду, од 25 до 50 година старости, са ИТМ = 30 – 39,9 kg m<sup>-2</sup> (гојазност тип 1 и 2) на:

- антропометријске параметре (телесна маса, садржај телесних масти, ИТМ)
- метаболичке параметре (глукоза, укупни холестерол, *LDL*-холестерол, *HDL*-холестерол, триглицериди)
- ниво инсулина
- ниво адипокина (лептин, адипонектин) и грелина
- параметре инфламације (*IL-6*, *IL-17*, *TNF*, *CRP*)
- хематолошке параметре
- одабране параметре целуларног и хуморалног имунитета
- промене епигенетских маркера повезаних са гојазношћу

## 3 ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ

### 3.1 Избор испитаница и дизајн студије

#### 3.1.1 Избор испитаница

Првобитни избор потенцијалних испитаница, прегледом медицинске документације и евалуацијом критеријума за укључивање и искључивање, обавио се просторијама Клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма Универзитетско-Клиничког Центра Србије у Београду уз консултацију лекара специјалиста ендокринологије. Седамдесет пет испитаница је позвано телефонским путем како би учествовале у студији, од којих је шездесет пристало и било укључено у студију. Испитанице су детаљно обавештене о процедури студије, потенцијалним нежељеним ефектима додатка исхрани, о томе да могу бити распоређене или у плацебо или у интервентну групу, али и да се у било ком тренутку својевољно могу повући из студије. Испитаницама је на располагање дат број телефона истраживача како би могле у било ком тренутку пријавити нежељене ефекте или питати нешто у случају недоумице.

#### 3.1.2 Дизајн студије

Истраживање је спроведено као рандомизована, двоструко слепа, плацебом-контролисана студија, која је трајала 12 недеља. За истраживање је добијена сагласност Етичког одбора Клиничког центра Србије (број 31/28, датум 21.02.2019). У циљу заштите података, студија је регистрована у регистру клиничких студија *Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR)*, регистрациони број *ACTRN12622000696796*.

##### *Одређивање величине узорка*

Применом *G-power software*, израчунато је да је за смањење нивоа *CRP* за 40%,  $\alpha = 0,05$  и  $\beta = 0,8$ , потребно укључити укупно педесет две испитанице, тј. двадесет шест испитаница по групи (136). Због непредвиђених услова и могућности одустајања од студије, на израчунати потребни број додато је још 10%, те је коначни број износио 58.

##### *Критеријуми за укључивање у студију*

- старост већа од 25 година
- ИТМ = 30 – 39,9 kg m<sup>-2</sup>

##### *Критеријуми за искључивање из студије*

- хронично обољење бубрега, штитне жлезде и гастроинтестиналног тракта (Кронова болест, улцерозни колитис),
- менопауза,
- узимање антибиотске терапије и примена пробиотских препарата у последњих месец дана,
- старост испод 25 година,
- узимање додатака исхрани са пробиотицима, дијетним влакнима,
- преосетљивост/интолеранција на било који састојак производа,
- трудноћа или дојење.

На основу критеријума за укључивање у студију, размотрено је и прегледано 60 гојазних жена као потенцијалних испитаница, од којих је 5 искључено из студије из разлога

неиспуњавања критеријума, употребе антибиотика или одлуке да не учествују у студији. Коначан број регрутованих испитаница је износио 55, од којих је 27 распоређено у контролну групу, а 28 у интервентну групу. Током 12 недеља интервенције, од студије је одустало или искључено (операција, употреба антибиотика услед COVID-19 пандемије) 7 испитаница, те је коначан број испитаница на крају студије износио 48 (23 у контролној групи, 25 у интервентној групи).

Како би се распоредиле испитанице у интервентну и контролну групу коришћена је једноставна метода рандомизације помоћу компјутерског софтвера. Студија је спроведена као двоструко слепа због чега ни испитанице ни истраживачи ни лекари нису знали која је група интервентна а која контролна. Произвођач је припремио капсуле идентичног изгледа за обе групе у смислу боје величине и облика, а биле су означене шифром „1“ или „2“. Слика 13 приказује протокол студије и регрутовања испитаница.



Слика 13. CONSORT дијаграм који описује процес регрутације испитаница и ток студије

### 3.1.3 Протокол студије

Након давања писменог пристанка о учешћу, у студију су укључене испитанице које су испуњавале наведене критеријуме. Након укључивања у студију, испитанице су позване да дођу у прву посету, дан прије почетка студије, као и у другу посету, након 12 недеља интервенције.

У току студије спроведене су две посете:

- Посета I: узимање анамнезе и преглед ендокринолога, увођење пацијената и попуњавање документације, антропометријски преглед, детаљно информисање пацијената о студији, узимање узорака крви, попуњавање 24-сатне дијете по сећању. Испитанице су насумично подељени у две групе, а ни лекар/истраживач, ни пацијенти нису знали у којој се групи налазе. Испитанице су при посети I добиле капсуле у тачној количини потребној за 3 месеца уз упутство да врате све што не попију у циљу бољег праћења просечне комплијансе.
- Посета II: након 3 месеца – клинички преглед ендокринолога, мерење антропометријских параметара, евалуација и бележење евентуалних нежељених ефеката, узимање узорака крви за анализу, попуњавање 24-сатне дијете по сећању, провера да ли су редовно користили производ како би се проценила просечна комплијанса. Провере просечне комплијансе су обављене путем телефонских позива једанпут месечно у току сва три месеца трајања студије. Такође, забележен је и број враћених капсула.

### 3.2 Материјал за дијетарну интервенцију

Интервентна група је једанпут дневно пила по 1 капсулу након доручка која садржи  $7 \times 10^{10}$  CFU *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (DSM9843),  $5 \times 10^9$  CFU *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (DBVPG6763), 44,44 mg сувог екстракта воска шећерне трске стандардизованог на 90% октакозанола, од тога 40 mg октакозанола, док је контролна група пила плацебо (парцијално хидролизоване кукурузне скроб, магнезијум-стеарат) спакован у 1 капсулу. Обе групе су добиле капсуле идентичног изгледа. Капсуле коришћене за обе групе биле су од хидроксипропилметилцелулозе (ХПМЦ). За потребе студије *AbelaPharm* д.о.о. Вилине воде, Београд, произвели су капсуле за интервентну и контролну групу на основу инструкција датих од стране истраживача.

### 3.3 Узорковање биолошког материјала

Пре самог узорковања, испитаницима се посебно скреће пажња да не конзумирају никакву храну и пиће, 12 сати пре предвиђених анализа. Медицинска сестра обавила је узорковање биолошког материјала испитаница у просторијама Клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма Универзитетско-Клиничког Центра Србије у Београду, стандардизованим поступком венепункције и то укупно два пута, дан пре почетка и дан након завршене дијетарне интервенције. Крв је узоркована из предње кубиталне вене, у периоду између 9.00 и 10.00 часова употребом затвореног система за венепункцију (одговарајући вакутејнери за добијање серума, плазме и пуне крви, игле промера 22 гоца, адаптер и повеска). За добијање серума коришћени су вакутајнери са гелом без антикоагуланса, за добијање цитратне плазме коришћени су вакутајнери са 3,2% Na – цитратом као антикоагулансом и за добијање пуне крви коришћени су вакутајнери са антикоагулансом ди-калијум ди-хидрокси етилен-диамино-тетрасирћетна киселина ( $K_2 \times 2H_2O$  EDTA) произвођача *Becton Dickinson and Company*. Узорци који нису исти дан обрађивани, прописно су складиштени на  $-20$  °C до наредне обраде. Након узорковања венске крви, узоркован је узорак капиларне крви из домалог прста на специјалне филтер папире у сврху спровођења епигенетских анализа.

### 3.4 Методе

#### 3.4.1 Антропометријски параметри

Процена телесне композиције испитаника (телесна маса, проценат масти у организму, ИТМ) одрађена је методом биоелектричне импеданце помоћу медицинске ваге *Tanita Body Composition Analyser BC-420MA*. ИТМ рачунат је као количник тежине и квадрата висине ( $\text{kg m}^{-2}$ ). Нутритивни статус процењен је на основу анализе уноса хране у претходна 24 сата помоћу програма „Програм прехране“, верзија 6.46.2, IG PROG, Хрватска.

#### 3.4.2 Одређивање основних биохемијских параметара

Основне лабораторијске и биохемијске анализе обухватале су одређивање: глукозе, параметара липидног статуса (укупни холестерол, *LDL*-холестерол, *HDL*-холестерол, триглицериди) и *CRP*. Глукоза и параметри липидног статуса одређени су употребом комерцијалних реагенаса (*Beckman Coulter, Inc. USA i BioSystem*, Барселона, Шпанија), применом стандардизованих спектрофотометријских и имунотурбидиметријске методе на биохемијском анализатору *Olympus AU400 (Beckman Coulter, Inc, USA)*. Инсулин је одређен употребом комерцијалних реагенаса (произвођач *Beckman Coulter*), применом хемилуминисцентне имунохемијске методе на имунохемијском анализатору *Access 2 (Beckman Coulter, Inc. USA)*, док су концентрације *CRP* одређене имунотурбидиметријском методом на биохемијском анализатору *Olympus AU400 (Beckman Coulter, Inc, USA)*. Пре анализирања узорак у серији спроведена је унутрашња контрола квалитета употребом комерцијалних контролних узорак специфичних за сваки појединачни параметар.

#### 3.4.3 Одређивање адипоцитокина и хормона који имају утицај на апетит

Из прикупљених узорак, у Лабораторији за медицинско-биохемијске анализе и лабораторијама Катедре за броматологију и Катедре за медицинску биохемију Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, применом Ензимски повезаних имуносорбентних тестова (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*) одређене су концентрације адипонектина, лептина, грелина, као и одабраних маркера инфламације (*TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-17*). За испирање и читавање микротитарских плоча користили смо аутомат за испирање *RT 2600C Washer* микротитар плоча и *RT-6100* читач микротитар плоча, (*Rayto Life and Analytical Sciences Co. Ltd*, Кина).

#### *Одређивање концентрација грелина у серуму*

##### **Реагенси:**

*ELISA* микротитарска плоча за одређивање хуманог грелина

Хумани стандард грелина

Биотином обележена поликлонска антитета

Раствор за испирање

Стрептавидин пероксидаза (СП) конјугат

Раствор супстрата (водоник пероксид и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ))

Стоп раствор ( 0,5 N хлороводонична киселина)

**Осетљивост теста:** 0,15 ng/mL

**Опсег теста:** 0,125 – 32 ng/mL

**Поступак:**

Узорци су анализирани коришћењем комерцијалног теста *Human Ghrelin ELISA Kit* (Novus Biological, 614 McKinley Place NE Minneapolis) према упутству произвођача. У сваки базенчић микротитарске плоче додато је по 50  $\mu$ L узорка. Након два сата инкубирања на собној температури и испирања базенчића, додато је 50  $\mu$ L биотином обележеног поликлонског антитета који је са узорцима инкубиран један сат. Након процеса испирања, у сваки базенчић додато је 50  $\mu$ L СП конјугата и инкубирано тридесет минута. Потом, након испирања, додат је раствор супстрата који садржи водоник пероксид и ТМБ раствор, када долази до појаве плаве боје. Додатком стоп раствора зауставља се развијање боје и долази до преласка плаве у жуту боју. Интензитет боје мери се помоћу *ELISA* читача на 450 nm таласне дужине, и пропорционалан је концентрацији грелина.

**Одређивање концентрација лептина у серуму**

**Реагенси:**

*ELISA* микротитарска плоча за одређивање хуманог лептина

Хумани стандард лептина

Конјугат за хумани лептин (поликлонско антитело конјуговано са пероксидазом)

Есеј и калибратор дилуент

Раствор за испирање

Раствор супстрата (водоник пероксид и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ))

Стоп раствор ( 2 N сумпорна киселина)

**Осетљивост теста:** 7,8 pg/mL

**Опсег теста:** 15,6 – 1000 pg/mL

**Поступак:**

Узорци су анализирани коришћењем комерцијалног теста *Human leptin Quantikine ELISA Kit* (R&D systems, Висбаден, Немачка) према упутству произвођача. Након есеј дилуента, у сваки базенчић микротитарске плоче додато је по 100  $\mu$ L узорка. Након инкубације на собној температури и процеса испирања, у сваки базенчић додато је по 200  $\mu$ L конјугата и инкубирано сат времена на собној температури. После поновног испирања базенчића, додат је раствор супстрата који садржи водоник пероксид и ТМБ раствор, када долази до појаве плаве боје. Додатком стоп раствора зауставља се развијање боје и долази до преласка плаве у жуту боју. С обзиром на то да је концентрација лептина пропорционална интензитету жуте боје, интензитет боје мери се помоћу *ELISA* читача на 450 nm таласне дужине.

### **Одређивање концентрација адипонектина у серуму**

#### **Реагенси:**

*ELISA* микротитарска плоча за одређивање хуманог адипонектина

Хумани стандард адипонектина

Конјугат за хумани адипонектин (поликлонско антитело конјуговано са пероксидазом)

Есеј и калибратор дилуент

Раствор за испирање

Раствор супстрата (водоник пероксид и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ))

Стоп раствор ( 2 N сумпорна киселина)

**Осетљивост теста:** 0,891 ng/mL

**Опсег теста:** 3,9 – 250 ng/mL

#### **Поступак:**

Пре анализе, узорци су разблажени 10 x, према препоруци произвођача. Узорци су анализирани коришћењем комерцијалног теста *Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit (R&D systems*, Висбаден, Немачка) према упутству произвођача. Након есеј дилуента, у сваки базенчић микротитарске плоче додато је по 50 µL узорка. Након инкубације на собној температури и процеса испирања, у сваки базенчић додато је по 200 µL конјугата и инкубирано два сата на собној температури. После поновног испирања базенчића, додат је раствор супстрата који садржи водоник пероксид и ТМБ раствор, када долази до појаве плаве боје кроз тридесет минута. Додатком стоп раствора зауставља се развијање боје и долази до преласка плаве у жуту боју. Интензитет боје мери се помоћу *ELISA* читача на 450 nm таласне дужине, помоћу чега се добију концентрације адипонектина у узорцима.

### **Одређивање концентрација IL-6 у серуму**

#### **Реагенси:**

*ELISA* микротитарска плоча за одређивање хуманог IL-6

Хумани IL-6 стандард

Конјугат за хумани IL-6 (поликлонско антитело конјуговано са пероксидазом)

Есеј и калибратор дилуент

Раствор за испирање

Раствор супстрата (водоник пероксид и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ))

Стоп раствор ( 2 N сумпорна киселина)

**Осетљивост теста:** 0,626 pg/mL

**Опсег теста:** 3,1 – 300 pg/mL



### **Поступак:**

Узорци су анализирани коришћењем комерцијалног теста *Human IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Висбаден, Немачка)* према упутству произвођача. Након додавања раствора за разблаживање узорка, у сваки базенчић микротитарске плоче додато је по 100  $\mu\text{L}$  узорка. Након два сата инкубирања на собној температури, следи испирање базенчића, а затим додавање 200  $\mu\text{L}$  конјугата који је са узорцима инкубиран два сата. После процеса испирања, додат је раствор супстрата који садржи водоник пероксид и ТМБ раствор, када долази до појаве плаве боје. Додатком стоп раствора зауставља се развијање боје и долази до преласка плаве у жуту боју. С обзиром на то да је концентрација *IL-6* пропорционална интензитету жуте боје, интензитет боје мери се помоћу *ELISA* читача на 450 nm таласне дужине.

### **Одређивање концентрација *TNF* у серуму**

#### **Реагенси:**

*ELISA* микротитарска плоча за одређивање хуманог *TNF*

Хумани *TNF* стандард

Конјугат за хумани *TNF* -(поликлонско антитело конјуговано са пероксидазом)

Есеј и калибратор дилуент

Раствор за испирање

Раствор супстрата (водоник пероксид и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ))

Стоп раствор ( 2 N сумпорна киселина)

**Осетљивост теста:** 6,23 pg/mL

**Опсег теста:** 15,6 – 1000 pg/mL

#### **Поступак:**

Узорци су анализирани коришћењем комерцијалног теста *Human TNF Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Висбаден, Немачка)* према упутству произвођача. Након есеј дилуента, у сваки базенчић микротитарске плоче додато је по 50  $\mu\text{L}$  узорка. После тога уследила је инкубација на собној температури и орбиталном шејкеру на 500 rpm. Затим, уследило је испирање базенчића, у које је додато 200  $\mu\text{L}$  конјугата који је са узорцима инкубиран два сата. После процеса испирања, додат је раствор супстрата који садржи водоник пероксид и ТМБ раствор, када долази до појаве плаве боје. Додатком стоп раствора зауставља се развијање боје и долази до преласка плаве у жуту боју. С обзиром на то да је концентрација *TNF* пропорционална интензитету жуте боје, интензитет боје мери се помоћу *ELISA* читача на 450 nm таласне дужине.

### **Одређивање концентрација *IL-17* у серуму**

#### **Реагенси:**

*ELISA* микротитарска плоча за одређивање хуманог *IL-17*

Хумани *IL-17* стандард

Конјугат за хумани *IL-17* (поликлонско антитело конјуговано са пероксидазом)

Есеј и калибратор дилуент

Раствор за испирање

Раствор супстрата (водоник пероксид и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ))

Стоп раствор ( 2 N сумпорна киселина)

**Осетљивост теста:** 15,0 pg/mL

**Опсег теста:** 31,3 – 2000 pg/mL

#### **Поступак:**

Узорци су анализирани коришћењем комерцијалног теста *Human IL-17 Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Висбаден, Немачка)* према упутству произвођача. У сваки базенчић микротитарске плоче додат је есеј дилуент и по 100  $\mu\text{L}$  узорка. Након три сата инкубирања на собној температури и испирања базенчића, додат је 200  $\mu\text{L}$  конјугата који је са узорцима инкубиран један сат. После процеса испирања, додат је раствор супстрата који садржи водоник пероксид и ТМБ раствор, када долази до појаве плаве боје. Додатком стоп раствора зауставља се развијање боје и долази до преласка плаве у жуту боју. Интензитет боје мери се помоћу *ELISA* читача на 450 nm таласне дужине, и пропорционалан је концентрацији *IL-17*.

#### **3.4.4 Одређивање хематолошких параметара**

За одређивање хематолошких параметара крви, узорци крви сакупљани су у вакутајнере са антикоагулансом  $\text{K}_2 \times 2\text{H}_2\text{O EDTA}$ , произвођача *Becton Dickinson and Company*. Хематолошке анализе спроведене су на Универзитетско-клиничком Центру Србије помоћу аутоматског анализатора крви *XN-1000 (Sysmex)* методом флуоресцентне проточне цитометрије. Анализирани параметри су укључивали параматре еритроцита (број еритроцита - *RBCs*, расподела еритроцита по волумену - *RDW*, хемоглобин - *Hgb*, хематокрит - *HCT*, просечни волумен еритроцита - *MCV*, просечна количина хемоглобина по еритроциту - *MCH*, просечна концентрација хемоглобина у еритроцитима – *MCHC*) и параметре крвних плочица (број крвних плочица – *PLT*, просечни волумен крвних плочица - *MPV*, расподела крвних плочица по волумену – *PDW* и тромбокрит – *PCT*).

#### **Морфолошке карактеристике еритроцита и тромбоцита**

Како би се испитале морфолошке карактеристике, размази крви припремани су у дупликуату за сваку испитаницу. За цитолошка испитивања крвних размаза коришћена је капиларна крв, а размази су потом осушени на собној температури, фиксирани у метанолу 15 минута и обојени *May-Grunwald-Giemsa* методом (200). За посматрање сваког узорка коришћено је 100 x увећање, како би се анализирали обојеност и облик еритроцита, као и изглед гранула, боја цитоплазме и облик крвних плочица. На основу морфолошких карактеристика, крвне плочице су класификоване у три групе: гранулисани (већина цитоплазме тамно обојена услед присуства гранула које су хомогено распоређене), хипогранулисани (без или са пар гранула) и активирани крвне плочице (округластог облика са псеудоподијама и гранулама доминантно распоређеним у централном делу крвних плочица). Величина крвних плочица одређена је као Феретов дијаметар, који представља највећу удаљеност између било које две тачке неког тела, и који се најчешће користи за мерење величине честица неправилног облика на оптичком

микроскопу (*Leica DMLB, Leica Microsystems, Germany*). Сва мерења спроведена су помоћу *ImageJ software (NIH, USA)*.

### **Одређивање концентрација фибриногена**

Концентрације фибриногена одређене су из цитратне плазме користећи референтну *Clauss* коагулометријску методу помоћу коагулометар *BFT II Analyzer*.

### **Одређивање концентрација *sP-selectin***

#### **Реагенси:**

*ELISA* микротитарска плоча за одређивање хуманог *sP-selectin*

Лиофилизовани стандард

Поликлонско антитело обележено биотином

*HRP-Streptavidin (SABC)* конјугат

Раствор за испирање

Раствор супстрата (водоник пероксид и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ))

Стоп раствор ( 2 N сумпорна киселина)

**Осетљивост теста:** 9.375 pg/mL

**Опсег теста:** 15,625 – 1000 pg/mL

#### **Поступак**

Пре анализе, узорци су разблажени 3x, према препоруци произвођача. Узорци су анализирани коришћењем комерцијалног теста *Human sSELP (soluble P-Selectin) ELISA Kit (FineTest®)*, Вухан, Кина) према упутству произвођача. У сваки базенчић се дода 100 µL узорка, а затим инкубира на 37 °C деведесет минута. Након испирања микротитарске плоче, дода се 100 µL биотином обележеног поликлонског антитела и инкубира сат времена на 37 °C. Плоча се поново испере према упутству, те се у сваки базенчић дода по 100 µL *SABC* раствора. Након поновног испирања, дода се раствор супстрата који садржи водоник пероксид и ТМБ раствор, при чему се развија плава боја. Додатком стоп раствора плава боја прелази у жуту, чији се интензитет мери на 450 nm таласне дужине и пропорционалан је концентрацији *sP-selectin*.

### **3.4.5 Одређивање параметара хуморалног и целуларног имунитета**

У циљу процене статуса имуног система, у лабораторији Институту за вирусологију, вакцине и серуме Торлак одређени су одабрани имунолошки параметри: леукоцитарна формула и заступљеност лимфоцитних популација ( $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD56^+$ ,  $CD4^+CD45RO^+$ ) методом проточне цитометрије (проточни цитофлуориметар – *FACSVerse, BD Biosciences, San Jose, SAD*), као и нивои *IL-6* и *TNF-α* *ELISA* тестовима, након антигенске стимулације леукоцита периферне крви у *in vitro* условима. Антигенска стимулација рађена је помоћу ЛПС (из *E. coli*), пептидогликана (из *S. aureus*) и конканавалина А (*ConA*). Промене у хуморалном имунском одговору праћене су мерењем нивоа специфичних антитела на бактерију (*L. plantarum 299v*) и квасац (*Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*) којима су испитанице суплементирани. Мерени су нивои специфичних *IgG* и *IgA* антитела помоћу *ELISA* теста.

Време згрушавања је било 20 минута, собна температура. Урађено је центрифугирање (1500 x g, 15 мин, 4°C) и узорци су чувани на -20°C до анализе. Крв из K3EDTA епрувета је коришћена за фенотипску карактеризацију популације леукоцита и *in vitro* стимулацију производње цитокина антигеном.

### Мерење нивоа специфичних антитела

Ради мерења нивоа специфичних антитела коришћена је *ELISA* са целим микроорганизмима. Преконоћне културе *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (DBVPG6763) и *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (DSM9843) су центрифугиране (2000 x g, 20 мин, 4°C), испране једном и разблажене у физиолошком раствору пуферисаном фосфатом (*PBS*) до оптичке густине 0,1 на 620 nm у коначној запремини од 100 µL у плочи од 96 бунарчића. Након наношења 100 µL по бунарчићу на *MakiSorp ELISA* плоче (*Nunc, ThermoFisher Scientific, Данска*), плоче су центрифугиране (1000 x g, 20 мин, 24°C) и супернатант је уклоњен. Плоче су сушене на 50 °C два сата и чуване не дуже од 10 дана пре употребе.

Поступак је изведен према референци Никодијевић и сар. (201). Плоче су блокиране са 2% говеђег серумског албумина (*BSA*) у *PBS* на собној температури током 1 часа, а затим испране 3 пута са *PBS*-ом. За анализу специфичних *IgG*, серуми су разблажени 400 x у 1% *BSA/PBS*. Серуми су инкубирани 1 час на собној температури и затим испрани 3 пута са 0,05% *Tween 20* у *PBS*-у (*TPBS*). Коришћена су следећа секундарна антитела: Fc фрагмент моноклонског анти-хуманог *IgG* антитела (специфичног за Fc фрагмент) биотин конјугат, анти-хумани *IgA* (специфичан за α-ланец) (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD*). За анализу поткласа *IgG*, коришћена су моноклонска антитела анти-хумани *IgG1* и *IgG2*, произведени у мишу и обележени биотином (*BD Biosciences, Калифорнија, САД*). Сва секундарна антитела су инкубирана током 1 часа на собној температури. После испирања 3 x са *TPBS* и 1 x са *PBS*, додат је стрептавидин конјугован са пероксидазом из рена (*Biolegend, San Diego, CA, САД*) и инкубиран 1 сат на собној температури. Као супстрат је коришћен *SigmaFast OPD* (*Sigma Aldrich*). Апсорбанца је прочитана на 492 nm са референтном таласном дужином на 620 nm. Сваки узорак је мерен у дубликату, а коефицијенти варијације унутар теста били су испод или једнаки 10% за све изведене *ELISA* тестове.

### Одређивања заступљености леукоцитних и лимфоцитних популација проточном цитометријом

Крв у мировању из K3EDTA Vacutainer епрувета коришћена је за фенотипску карактеризацију популације леукоцита периферне крви. FACS епрувете су напуњене са 100 µL крви и додато је по 4 µL антитела. Коришћена су антитела за следеће антигене CD3 (ОКТ-3 мишији *IgG2a FITC*), CD4 (MEM-241 мишији *IgG1 PE*), CD8 (HIT8a мишији *IgG1,k PE*), CD56 (MEM-188 мишији *IgG2a PE*) и CD45RO (*UCHL1* мишији *IgG2a FITC*). Сва антитела су коришћена у складу са препорукама произвођача (*Immunotools, Friesoithe, Немачка*). После инкубације (20 мин, 20 °C, у мраку), додато је 2 mL раствора за лизу, раствор је промешан и инкубиран 10 мин. на 20 °C. Суспензија је центрифугирана на 400 x g током 10 мин, супернатант је аспириран и талог је испран два пута са 3 mL 2% *BSA/PBS*. Под испирањем се подразумевало да је на талог сипана течност, талог је промућкан, након чега је центрифугиран на 400 x g. Након испирања додато је 200 µL *PBS* са 0,4% FA. Сигнал је анализиран са *FACSVerse* (*BD Biosciences, San Jose, CA, САД*). Процентни  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD56^+$ ,  $CD3^-CD56^+$ ,  $CD4^+CD45RO^+$  субпопулација лимфоцита су изведени из одговарајућих резултата добијених у анализама проточне цитометрије.

### Стимулација ћелија и мерење цитокина

Пуна крв је разблажена 1:5 у комплетном *RPMI* 1640, 50  $\mu$ M  $\beta$ -меркаптоетанола са 10% *FCS* и ћелије су стимулисане са ЛПС из грам негативне бактерије *Escherichia coli* O111:B4 (L4524, Sigma), тако што је на 1 ml разблажене периферне крви додато 10  $\mu$ l раствора ЛПС концентрације 1  $\mu$ g/ml у *RPMI* 1640, тако да је финална концентрација износила 10 ng/ml и пептидогликаном из грам позитивне бактерије *Staphylococcus aureus* (77 140, Sigma) концентрације 1  $\mu$ g/ml у *RPMI* 1640, тако да је финална концентрација износила 10 ng/ml. Осим тога разблажена суспензија ћелија периферне крви стимулисана је помоћу Concanavalin A из *Canavalia ensiformis* финалне концентрације 10  $\mu$ g/ml и нестимулисане ћелије су коришћене као контрола. Ћелије су култивисане на 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> током 24 часа. После центрифугирања на 400 x g током 10 минута на 4 °C, супернатанти су скупљени и чувани замрзнути на -80 °C. Нивои *TNF* и *IL-6* мерени су комерцијалним *ELISA* тестом (*R&D Systems*®, *SAD*), у дупликату према препорукама произвођача.

### Одређивање нивоа укупног *TGF- $\beta$ 1*

Ниво *TGF- $\beta$ 1* је мерен директно из серума. Укупни *TGF- $\beta$ 1* добијен је активацијом латентног *TGF- $\beta$ 1* киселом хидролизом након које је следила неутрализација. Узорци су разблажени укупно 7 пута, а концентрације су измерене комерцијалним *ELISA* тестом (*Human/Mouse TGF beta 1 ELISA Read-SET-Go*, *eBioscience*, *San Diego*, САД). Узорци су анализирани у дупликату; коефицијент варијације унутар теста био је 11,06%.

### 3.4.6 Одређивање епигенетских маркера

Прикупљање капиларне крви за одређивање епигенетских маркера вршило се из домалог прста недоминантне руке помоћу филтер папира *Whatman*® *Protein Saver cards* (*Sigma-Aldrich*, *Vienna*, *Austria*), користећи *Extra 18G* ланцете (*Sarstedt*, *Germany*). Осушени узорци капиларне крви су до обраде били складиштени на - 20 °C.

#### *ДНК/РНК екстракција*

Четири узорка дијаметра 4 mm узето је са сваког папира који садржи узорке осушене капиларне крви и додато у раствор протеазе, након чега су узорци инкубирани преко ноћи у *ThermoMixer*. ДНК и РНК су екстраховане помоћу *KingFisher™ Duo Prime Purification System* и *MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra Kit* складно протоколу написаном од стране произвођача (*Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*).

#### *cDNA синтеза miRNA i mRNA*

Како би се припремиле основе (темплејти) за детекцију и квантификацију *miRNA*, екстрахована РНК мора бити преписана на комплементарну ДНК (*complementary DNA, cDNA*). Синтеза *cDNA* помоћу реакција полиаденилатних репова, реакције лигације, реверзне транскрипције и амплификације спроведена је користећи *SimpliAmp™ Thermal Cycler* (*Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific*) и *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* према упутству произвођача (*Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific*). Темплејти *cDNA* су разблажени у омјеру 1:10 а затим складиштени на - 20 °C. *cDNA* од *mRNA* је припремљена користећи *LunaScript RT SuperMix Kit* према упутству произвођача (*Biolabs, Heidelberg, Germany*).

#### *miRNA u mRNA експресија*

Промене у *miRNA i mRNA* експресији гена повезаних са гојазношћу и инфламацијом одређену су помоћу комерцијално доступних прајмера (*ThermoFisher, Waltham, MA, USA*). Све

*mRNA* нормализоване су на  $\beta$ -актин, док су све *miRNA* нормализоване на *miR-93-5p* као ендегену контролу. За одређивање *miRNA* и *mRNA*, PCR реакциона смеша за сваку *miRNA* садржала је *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific)*, *TaqMan™ Advanced miRNA* или *mRNA Assay (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific)* and нуклеаза-слободну воду. Реакција ланчаном умножавања (*real-time polymerase chain reaction, qPCR*) спроведена је користећи *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System* према стандардним упутствима произвођача (*Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific*). Генерисани подаци обрађени су користећи *Applied Biosystems™ Real-Time PCR Analysis Modules (Thermo Fisher Scientific)*.  $\Delta C_t$  метода кориштена је како би се израчунала експресија *miRNA* и *mRNA*. Средња вредност  $C_t$  сваког узорка нормализована је на средњу  $C_t$  вредност домаћинског гена *miR-93-5p* како би се израчунала  $\Delta C_t$  вредност.

### 3.5 Статистичка анализа

Статистичка обрада података извршена је *SPSS* софтвером (*SPSS v. 20.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA*). Нормалност дистрибуције података проверена је *Shapiro-Wilk* тестом. Подаци чија је расподела следила нормалну дистрибуцију приказани су као средња вредност и стандардна девијација. Подаци који нису имали нормалну расподелу, проверена је дистрибуција логаритмованих података, а резултати су приказани као медијана и 95% интервал поузданости. Уколико логаритмовани подаци нису пратили нормалну дистрибуцију, њихова вредност приказана је као медијана и интерквartilни распон.

Континуиране варијабле које су следиле нормалну дистрибуцију, као и оне које су након логаритмовања следиле нормалну дистрибуцију, поређене су *Student t* – тестом. Варијабле чија дистрибуција није пратила нормални ток, поређене су *Mann-Whitney U* тестом. За анализирање више група параметарских података коришћене су једнофакторска и двофакторска анализа варијансе (*analysis of variance, ANOVA*) са понављањем, са *Bonferroni post hoc* тестом.

Како би се одредиле корелације између параметара анализираних у студији, коришћена је *Pearson* корелациоина анализа код података са нормалном дистрибуцијом, односно *Spearman* непараметарска корелациона анализа код података који нису имали нормалну дистрибуцију.

Вредности  $p \leq 0,05$  сматране су статистички значајним за све спроведене анализе.

## 4 РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Основни демографски подаци

Демографски подаци испитаница приказани су у Табели 3. Вредности представљених параметара нису се статистички значајно разликовале између контролне и интервентне групе.

**Табела 3.** Демографски подаци испитаница на почетку студије

	Контролна група (N=23)	Интервентна група (N=25)	p
Старост ± SD (године)	39,04 ± 8,35	39,33 ± 9,60	0,913
Висина ± SD (m)	1,65 ± 0,08	1,66 ± 0,07	0,522
Тежина ± SD (kg)	102,39 ± 19,12	95,10 ± 14,28	0,535
Пушачи (%)	12 (52,17)	7 (25)	0,087
Етничка припадност <sup>#</sup> (%)	23 (100)	25 (100)	1,000

<sup>#</sup>Бела раса.

### 4.2 Утицај пробиотске формулације на антропометријске параметре

Иако је уочен статистички значајан ефекат времена на ТМ ( $F = 14,34$ ,  $p < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,242$ ) и ИТМ ( $F = 15,99$ ,  $p < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,258$ ), на крају дијетарне интервенције није уочена статистички значајна промена између контролне и интервентне групе (ТМ  $p = 0,137$ , ИТМ  $p = 0,072$ ). На проценат телесних масти није уочен значајан ефекат времена, третмана или интервенције.

**Табела 4.** Вредности ТМ и ИТМ пре и након интервенције

		ТМ	ИТМ	% Телесних масти
КГ	T0	102,39 ± 19,12	39,22 ± 7.39	42,34 ± 5,44
	T1	99,03 ± 18,20	37,32 ± 6.62	42,06 ± 4,78
ИГ	T0	95,10 ± 14,28	34,91 ± 5.33	45,53 ± 4,39
	T1	92,67 ± 14,35	33,53 ± 5.10	45,79 ± 5,51
ЕИ (p, $\eta^2$ )		0,542; 0,008	0,275; 0,026	0,617; 0,016
ЕВ (p, $\eta^2$ )		<0,001; 0,242	<0,001; 0,258	0,987; <0,001
ЕТ (p, $\eta^2$ )		0,159; 0,044	0,063; 0,073	0,159; 0,120

ЕИ – ефекат интеракције; ЕВ – ефекат времена; ЕТ – ефекат третмана;



### 4.3 Дијетарне навике

Дијетарне навике испитаница, након попуњавања упитника о исхрани и физичкој активности, приказане су у Табели 5. Фреквенца уноса намирница и физичка активност испитаница нису се статистички значајно разликовале између контролне и интервентне групе.

**Табела 5.** Подаци о дијетарним навикама и физичкој активности испитаница

<b>Фреквенца уноса намирница</b>			
<b>Воће и поврће</b>			
Повремено	2 (8,69 %)	3 (12,00 %)	0,708
Сваки други дан	5 (21,74 %)	5 (20,00 %)	0,882
Сваки дан	15 (65,22 %)	16 (64,00 %)	0,929
Више пута / дан	1 (4,35 %)	1 (4,00 %)	0,952
<b>Месо</b>			
Ретко, скоро никада	/	/	/
1-6 пута / 7 дана	14 (60,86 %)	16 (64,00 %)	0,823
Сваки дан	8 (34,78 %)	8 (32,00 %)	0,838
Више пута / дан	1 (4,35 %)	1 (4,00 %)	0,952
<b>Риба</b>			
Ретко, скоро никада	10 (43,48 %)	11 (44,00 %)	0,971
Једном седмично	11 (47,82 %)	12 (48,00 %)	0,990
2-3 пута / 7 дана	2 (8,69 %)	2 (8,00 %)	0,931
≥ 4 / 7 дана	/	/	/
<b>Млечни производи</b>			
Никада	/	1 (4,00 %)	0,601
Повремено	12 (52,17 %)	14 (56,00 %)	0,790
Сваки дан	11 (47,82 %)	10 (40,00 %)	0,585
Неколико пута / дан	/	/	/
<b>Физичка активност*</b>			
Ретко, скоро никада	19 (82,61 %)	19 (76 %)	0,573
1 – 2 пута / 7 дана	1 (4,35 %)	2 (4,00 %)	0,602
Минимум 2 пута седмично	3 (13,04 %)	4 (16 %)	0,772

\*Односи се на интензивну физичку активност која траје више од 30 минута.

#### 4.4 Утицај пробиотске формулације на метаболичке параметаре

У Табели 6 приказане су вредности глукозе, инсулина и липидних параметара, на почетку и након 12 недеља дијетарне интервенције. Комбинованом анализом варијансе поновљених мерења на почетку студије нису уочене статистички значајне разлике анализираних параметара између контролне и интервентне групе.

**Табела 6.** Концентрације глукозе, инсулина и липидних параметара на почетку и након 12 недеља дијетарне интервенције

	Група	T0	T1	ЕИ (p, $\eta^2$ )	ЕВ (p, $\eta^2$ )	ЕТ (p, $\eta^2$ )
<b>ТС</b> (mmol/L)	КГ	4,83 ± 1,16	4,68 ± 0,73	0,122; 0,060	0,209; 0,040	0,915; <0,001
	ИГ	5,18 ± 1,31	5,75 ± 1,69			
<b>HDL</b> (mmol/L)	КГ	1,31 ± 0,30	1,35 ± 0,36	0,293; 0,028	<b>0,006*</b> ; <b>0,178</b>	0,898; 0,000
	ИГ	1,34 ± 0,26	1,38 ± 0,40			
<b>LDL</b> (mmol/L)	КГ	2,99 ± 1,06	2,80 ± 0,73	0,492; 0,012	0,750; 0,003	0,993; <0,001
	ИГ	3,16 ± 1,10	3,56 ± 1,12			
<b>TG</b> (mmol/L)	КГ	1,20 ± 0,49	1,15 ± 0,49	0,465; 0,014	0,063; 0,086	0,492; 0,012
	ИГ	1,52 ± 0,55	1,18 ± 0,56			
<b>Глукоза</b> (mmol/L)	КГ	5,41 ± 0,56	5,65 ± 1,08	0,150; 0,048	0,455; 0,013	0,798; 0,002
	ИГ	5,95 ± 0,67	5,48 ± 1,18			
<b>Инсулин</b> ( $\mu$ IU/mL)	КГ	9,07 (7,21-20,16)	14,96 (7,15-24,25)	0,372; 0,028	0,279; 0,040	0,540; 0,013
	ИГ	7,99 (6,86-17,26)	9,33 (7,18-11,40)			

\**HDL* - значајне промене вредности након 12 недеља у интервентној групи (p = 0,03); ТГ-триглицериди; ЕИ – ефекат интеракције; ЕВ – ефекат времена; ЕТ – ефекат третмана;

Уочен је значајан ефекат времена ( $F = 8,45$ , p = 0,006,  $\eta^2 = 0,178$ ) на вредности *HDL*-холестерола, са значајно вишим вредностима (p = 0,03) у интервентној групи након три месеца суплементације новом пробиотском формулацијом. Статистички значајне разлике између контролне и интервентне групе нису уочене. Статистички значајан ефекат интеракције, времена или третмана није уочен на вредности укупног холестерола, *LDL*-холестерола, триглицерида, ка ни на вредности глукозе и инсулина. Значајно је истакнути да је у поређењу са контролном групом, *Post hoc* тест показао тенденцију ка снижењу концентрација триглицерида у интервентној групи након три месеца суплементације (p = 0,082). Такође, у интервентној групи након суплементације уочен је тренд пада концентрација глукозе (p = 0,070), заједно са концентрацијама инсулина (p = 0,074), у поређењу са контролном групом. *Post hoc* тест за укупни и *LDL*-холестерол надаље није показао статистички значајне разлике унутар или између група.

#### 4.5 Утицај пробиотске формулације на концентрације адипоцитокина

У Табели 7 приказане су вредности анализираних адипоцитокина на базалном нивоу, односно почетку студије и након 12 недеља дијетарне интервенције. На базалном нивоу, између контролне и интервентне групе нису уочене статистички значајне разлике анализираних параметара. Уочен је статистички значајан ефекат времена ( $F = 4,39$ ,  $p = 0,043$ ,  $\eta^2 = 0,101$ ) на концентрације *CRP*, док су утицај третмана и интеракције изостали. *Post hoc* тест показао је да су концентрације *CRP* статистички значајно ниже ( $p = 0,005$ ) у интервентној групи након 12 недеља дијетарне интервенције, док у контролној групи нису уочене статистички значајне промене. Додатно, у поређењу са контролном групом, у интервентној групи вредности *CRP* биле су статистички значајно ниже ( $p = 0,023$ ) након интервентног периода. Ефекат времена имао је, такође, статистички значајан утицај на вредности *IL-6* ( $F = 3,89$ ,  $p = 0,050$ ,  $\eta^2 = 0,191$ ), без значајног ефекта инетракције или третмана. Статистички значајно ниже концентрације ( $p = 0,012$ ) *IL-6* у серуму уочене су након интервенције новом пробиотском формулацијом у поређењу са базалним нивоом. У контролној групи нису уочене значајне промене. Статистички значајне разлике између група нису уочене на крају студије. Вредности *IL-17* остале су непромењене у обе групе током истраживања. Такође, вредности *TNF* нису се статистички значајно промениле након 12 недеља дијетарне интервенције ни у једној групи.

**Табела 7.** Концентрације адипоцитокина на почетку и након 12 недеља дијетарне интервенције

	<i>CRP</i> (mg/L)	<i>IL-6</i> (pg/mL)	<i>IL-17</i> (pg/mL)	<i>TNF</i> (pg/mL)
<b>КГ</b>	T0 4,00 (3,10 – 10,60)	4,54 (3,35 – 8,64)	33,00 (30,79 – 34,89)	25,92 (4,28 – 37,17)
	T1 4,40 (2,40 – 8,10)	5,5 (3,93 – 7,57)	35,25 (32,40 – 41,08)	24,44 (4,26 – 34,35)
<b>ИГ</b>	T0 5,7 (3,48 – 8,05)	5,44 (4,31 – 8,00)	34,64 (30,95 – 37,73)	26,13 (4,02 – 39,49)
	T1 2,95 (1,90 – 5,20)	4,01 (2,49 – 6,11)	37,06 (30,81 – 38,33)	23,29 (1,38 – 40,52)
<b>ЕИ</b> ( $p, \eta^2$ )	0,626; 0,006	0,154; 0,051	0,204; 0,162	0,202; 0,041
<b>ЕВ</b> ( $p, \eta^2$ )	<b>0,043*</b> ; 0,101	<b>0,050<sup>+</sup></b> ; 0,091	0,715; 0,014	0,886; 0,001
<b>ЕТ</b> ( $p, \eta^2$ )	0,210; 0,040	0,262; 0,032	0,813; 0,006	0,364; 0,021

\**CRP* - значајне промене вредности након 12 недеља у интервентној групи ( $p = 0,005$ ). Значајне промене у вредностима између група у T1 ( $p = 0,023$ ); <sup>+</sup>*IL-6* - значајне промене вредности након 12 недеља у интервентној групи ( $p = 0,012$ ). ЕИ – ефекат интеракције; ЕВ – ефекат времена; ЕТ – ефекат третмана;

#### 4.6 Утицај пробиотске формулације на концентрације хормона који имају утицај на апетит

У циљу испитивања утицаја нове пробиотске формулације на вредности хормона који имају утицај на апетит, одређене су концентрације адипонектина, лептина и грелина, како на базалном нивоу тако и након 12 недеља дијетарне интервенције (Табела 8). Иако на базалном нивоу није било разлике између група у концентрацијама испитиваних параметера, одређене промене уочене су након 12 недеља суплементације. Уочен је значајан ефекат интеракције времена и третмана ( $F = 12,09$ ,  $p = 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,216$ ) на концентрације грелина. У интервентној групи, концентрације грелина након 12 недеља суплементације биле су значајно више ( $p = 0,026$ ) у поређењу са базалним вредностима. У поређењу са контролном групом, концентрације грелина су на крају студије биле статистички значајно више ( $p = 0,006$ ) у интервентној групи. На концентрације лептина показан је значајан утицај времена ( $F = 4,00$ ,  $p = 0,049$ ,  $\eta^2 = 0,089$ ), без уоченог утицаја интеракције или третмана. Иако статистички значајне промене између група на крају дијетарне интервенције нису уочене, показан је тренд снижења концентрације лептина у интервентној у поређењу са контролном групом ( $p = 0,09$ ). Промене у концентрацијама адипонектина, након дијетарне интервенције, нити у једној групи нису примећене.

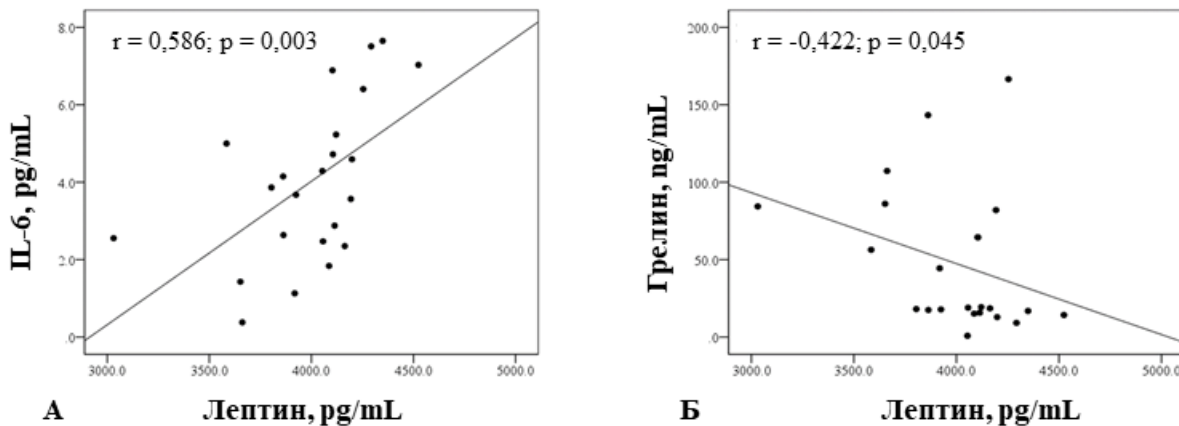
**Табела 8.** Концентрације хормона који утичу на апетит на почетку и након 12 недеља дијетарне интервенције

		Грелин (ng/mL)	Адипонектин (ng/mL)	Лептин (pg/mL)
КГ	T0	17,79 (12,93 – 60,64)	358,87 (312,69 – 382,27)	4158 (4042 – 4373)
	T1	10,93 (1,86 – 18,64)	367,08 (344,40 – 511,31)	4196 (3941 – 4331)
ИГ	T0	15,24 (4,69 – 29,63)	360,90 (348,67 – 426,55)	4124 (4017 – 4263)
	T1	18,78 (15,29 – 77,61)	365,18 (347,52 – 475,73)	4086 (3861 – 4192)
ЕИ ( $p$ , $\eta^2$ )		<b>0,001*</b> ; 0,216	0,061; 0,083	0,241; 0,033
ЕВ ( $p$ , $\eta^2$ )		0,691; 0,004	0,912; 0,000	<b>0,049<sup>+</sup></b> ; 0,089
ЕТ ( $p$ , $\eta^2$ )		0,140; 0,049	0,873; 0,001	0,547; 0,009

\*Грелин - значајне промене вредности након 12 недеља у интервентној групи ( $p = 0,026$ ). Значајне промене у вредностима између група у T1 ( $p = 0,006$ ); <sup>+</sup>Лептин – опадајући тренд вредности након 12 недеља у интервентној групи ( $p = 0,09$ ). ЕИ – ефекат интеракције; ЕВ – ефекат времена; ЕТ – ефекат третмана;

#### 4.6.1 Испитивање корелација адипоцитокина, хормона који регулишу апетити и метаболичких параметара

Даља испитивања укључивала су проверу постојања корелација између концентрација адипоцитокина, хормона који регулишу апетит и метаболичких параметара. Коришћена је метода *Spearman* – ове корелационе анализе, на базалном нивоу и након дијетарне интервенције. На крају студије, у интервентној групи концентрације лептина показале су статистички значајну позитивну корелацију са концентрацијама *IL-6* ( $r = 0,586$ ,  $p = 0,003$ ). Насупрот томе, концентрације лептина апоказале су негативну корелацију са вредностима грелина ( $r = -0,422$ ,  $p = 0,045$ ). Остали анализирани параметри нису били у значајној статистичкој корелацији, нити на базалном нивоу нити на крају студије. Статистички значајне корелације приказане су на Слици 14.



Слика 14. Корелације на крају студије у интервентној групи. (А) Корелације између вредности лептина ( $pg/mL$ ) и *IL-6* ( $pg/mL$ ). (Б) Корелације између вредности лептина ( $pg/mL$ ) и грелина ( $ng/mL$ ).

#### 4.7 Утицај пробиотске формулације на хематолошке параметре

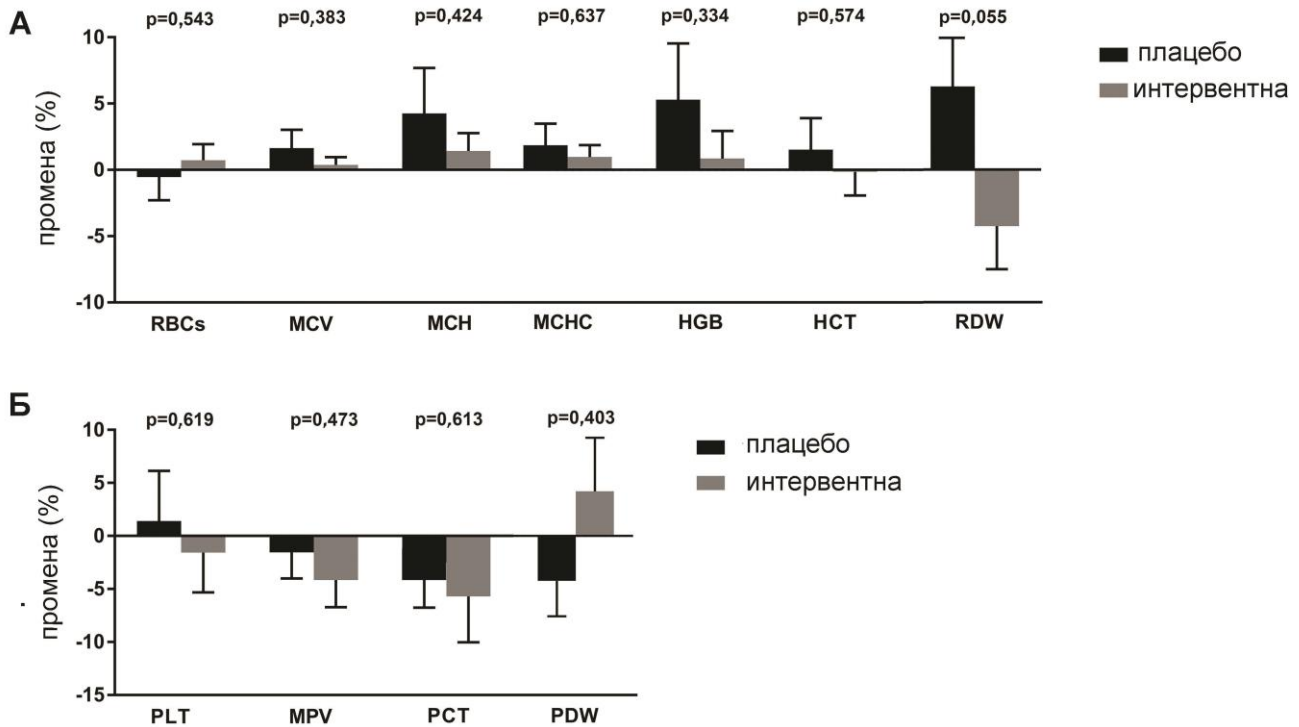
Хематолошки параметри испитаница контролне и интервентне групе, на почетку и на крају студије приказани су у Табели 9. Два анализирани параметра била су изван референтних вредности. Наиме, средња вредност за *MPV* на базалном нивоу била је изнад референтних вредности, да би се након дијетарне интервенције новом пробиотском формулацијом средња вредност за *MPV* смањила и достигла референтне вредности. Додатно, средња вредност за *PDW* била је испод референтних вредности за обе групе, у обе временске тачке мерења (Т0 и Т1). Суплементација новом пробиотском формулацијом довела је до повећања *PDW* вредности у интервентној у поређењу са контролном групом. Иако наведена промена није достигла статистичку значајност, важно је истакнути да су у интервентној групи након дијетарне интервенције вредности *PDW* скоро достигле референтне вредности.

**Табела 9.** Утицај дијетарне интервенције на хематолошке параметре на почетку студије и након 12 недеља. T0 означава почетак студије, T1 означава крај студије. Вредности су представљене као средње вредности и стандардна грешка. Статистички значајним су се сматрале вредности  $p < 0,05$ .

Параметар	Референтне вредности	Контролна		Интервентна	
		T0	T1	T0	T1
<b>RBC (<math>\times 10^{12}/L</math>)</b>	3,86 – 5,08	4,77 $\pm$ 0,11	4,73 $\pm$ 0,01	4,59 $\pm$ 0,06	4,63 $\pm$ 0,07
<b>HGB (g/L)</b>	122 – 157	144 $\pm$ 11	150 $\pm$ 12	133 $\pm$ 3	134 $\pm$ 3
<b>HCT (L/L)</b>	0,356 – 0,470	0,410 $\pm$ 0,007	0,415 $\pm$ 0,007	0,408 $\pm$ 0,005	0,407 $\pm$ 0,008
<b>MCV (fL)</b>	83 – 97	86 $\pm$ 1,2	88 $\pm$ 1,1	89 $\pm$ 1,2	89 $\pm$ 1,4
<b>MCH (pg)</b>	27,4 – 33,9	28,1 $\pm$ 1,0	29,0 $\pm$ 0,5	28,8 $\pm$ 0,6	29,2 $\pm$ 0,5
<b>MCHC (g/L)</b>	320 – 360	324 $\pm$ 5,0	331 $\pm$ 3,0	325 $\pm$ 3,0	328 $\pm$ 3,0
<b>RDW (%)</b>	12 – 15,5	13,7 $\pm$ 0,3	14,8 $\pm$ 0,4	14,9 $\pm$ 0,7	14,0 $\pm$ 0,4
<b>PLT (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	150 – 450	293 $\pm$ 13,4	294 $\pm$ 17,0	267 $\pm$ 11,7	262 $\pm$ 11,1
<b>MPV (fL)</b>	6,8 – 10,4	9,8 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 0,4
<b>PCT (%)</b>	0,158 – 0,425	0,294 $\pm$ 0,020	0,281 $\pm$ 0,010	0,285 $\pm$ 0,020	0,268 $\pm$ 0,010
<b>PDW (%)</b>	14 – 17,8	13,2 $\pm$ 0,4	13,0 $\pm$ 0,8	13,3 $\pm$ 0,5	13,8 $\pm$ 0,8

#### 4.7.1 Процентуалне промене хематолошких параметара еритроцита и тромбоцита

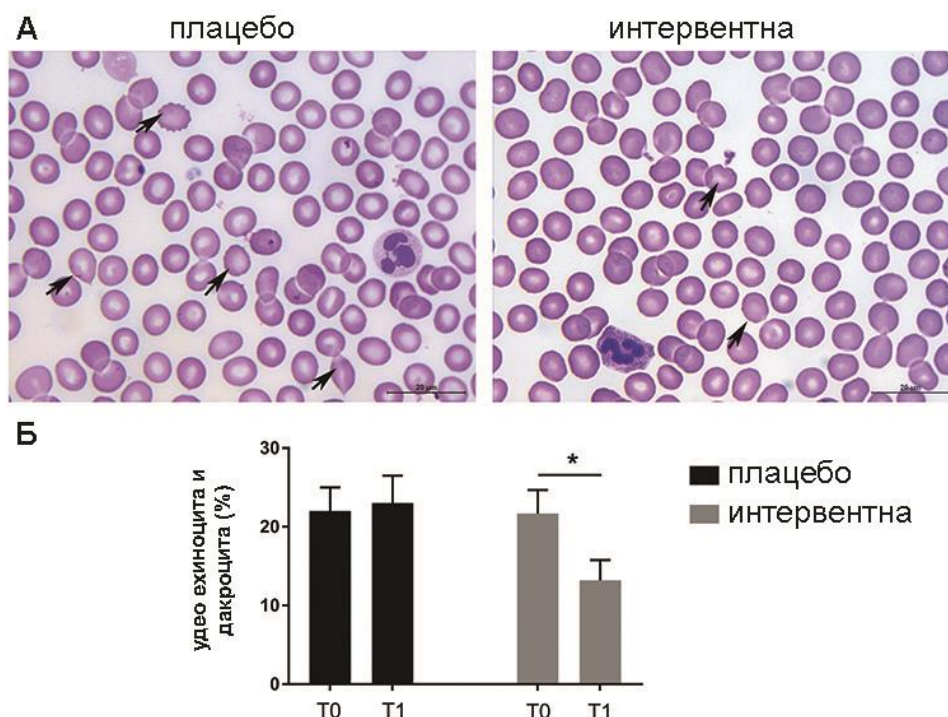
Како би се боље разумео и проценио утицај нове пробиотске формулације на хематолошке параметре, израчунате су делта ( $\Delta$ ) вредности и приказане као процентуалне промене анализираних параметара (Слика 15). Након 12 недеља дијетарне интервенције, вредности параметара карактеристичних за еритроците нису се значајно промениле ни у једној испитиваној групи (Слика 16А). Највеће промене које су биле уочене између контролне и интервентне групе односиле су се на *RDW* вредности ( $- 10,56 \pm 5,11$ ;  $p = 0,055$ ). Слика 16Б приказује процентуалне промене параметара карактеристичних за тромбоците. Вредности анализираних параметара након 12 недеља дијетарне интервенције нису се значајно промениле. Иако без статистичке значајности, највеће промене уочене за *PDW* вредности ( $- 5,110 \pm 5,98$ ).



**Слика 15.** Процентуалне промене ( $\Delta$ ) средњих вредности (А) Параметара карактеристичних за еритроците и (Б) Параметара карактеристичних за крвне плочице у контролној и интервентној групи. T0 означава почетак студије, T1 означава крај студије. Делта ( $\Delta$ ) вредност је израчуната према следећој формули:  $((T1/T0) - 1) \times 100$ . Вредности су представљене као средње вредности и стандардна грешка. Статистички значајним су се сматрале вредности  $p < 0,05$ .

#### 4.7.2 Анализа морфолошких промена еритроцита и тромбоцита

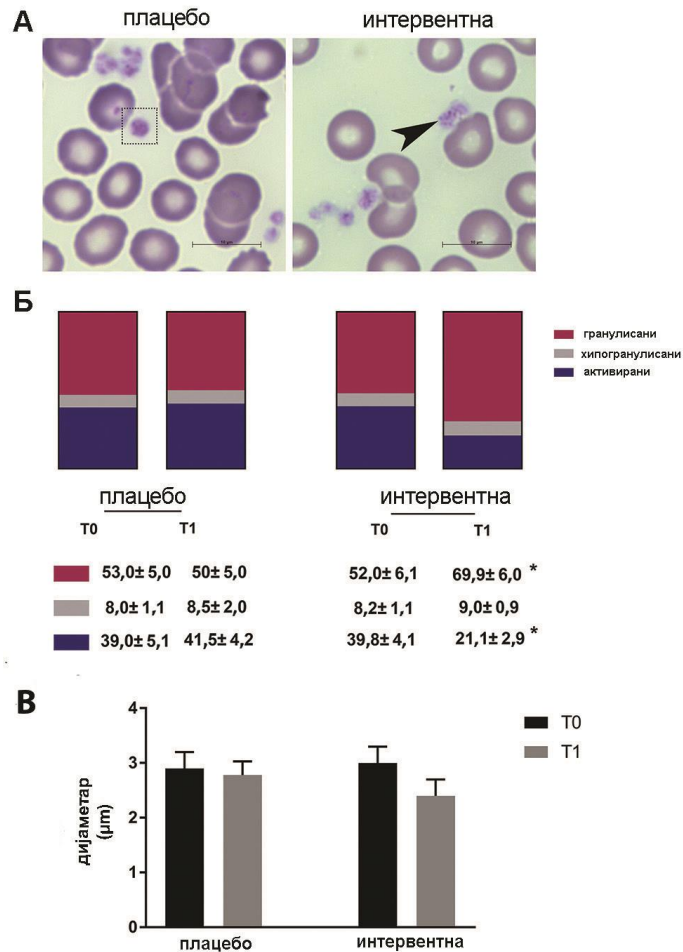
Морфолошка анализа крвних размаза узорака контролне и интервентне групе, показала је присуство нормоцитних (исте величине) и нормохромних еритроцита на базалном нивоу. Хипохромни и еритроцити различите величине су такође уочени, и то углавном у контролној групи. Додатно, еритроцити различитих облика уочени су на базалном нивоу, у обе групе. Умерене појаве ваљкастих или цилиндричних (*rouleaux*) формација примећене су у обе групе на почетку студије, уз присуство ехиноцита (еритроцити са специфичном морфологијом мембране, изгледа јежа) и дакроцита (еритроцити облика сузе) (Слика 16А). У поређењу са базалним нивоом, али и у поређењу са контролном групом, смањење појаве морфолошких абнормалности еритроцита примећено је у интервентној групи након дијетарне интервенције. Наведене микроскопске промене потврђене су применом методе рутинског бројања ћелија (Слика 16Б).



**Слика 16.** Репрезентативне микрографије крвних размаза који показују промену морфолошке промене еритроцита након дијетарне интервенције пробиотском формулацијом. (А) *May-Grunwald-Giemsa* методом обојени крвни размази. Примери еритроцита са абнормалним облицима обележени су стрелицом. Скала: 20  $\mu\text{m}$ . (Б) Представљање ехиноцита и дакроцита као процентуални удео свих еритроцита. Т0 означава почетак студије, Т1 означава крај студије. Вредности су представљене као средње вредности и стандардна грешка. Статистички значајним су се сматрале вредности  $p < 0,05$ .

Даље анализе укључивале су испитивање морфолошких промена крвних плочица (Слика 17А). Уопштено говорећи, крвне плочице анализираних узорка су се разликовале у величини, облику и изгледу гранула. Базирано на њиховим морфолошким карактеристикама, уочене су гранулиране, хипогранулиране и активирани крвне плочице. Наведене морфолошке промене подвргнуте су даљој морфометријској анализи, при чему су значајне статистичке промене детектоване у интервентној групи. У поређењу са базалним нивоом, у интервентној групи уочен је значајно већи ( $p < 0,05$ ) проценат гранулираних крвних плочица након 12 недеља дијетарне интервенције. Осим тога, значајно је истакнути да је проценат активираних крвних плочица значајно снижен ( $p < 0,05$ ) након интервенције пробиотском формулацијом (Слика 17Б). Иако не статистички значајно, након дијетарне интервенције уочен је тренд смањења дијаметра крвних плочица у поређењу са величином на базалном нивоу (Слика 17В).

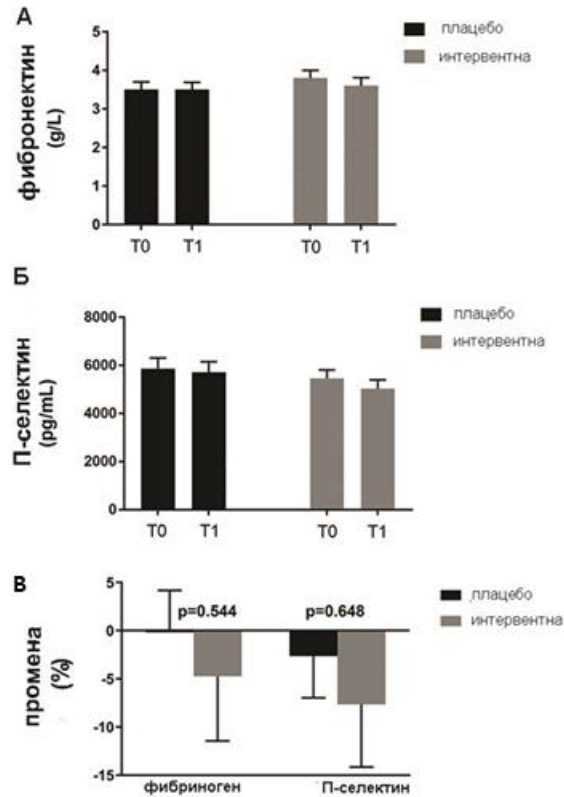




**Слика 17.** Морфолошки и морфометријски параметри крвних плочица. (А) Микроскопске слике бојене по *May – Grunwald* и *Giemsa* методама у контролној и интервентној групи након 12 недеља дијетарне интервенције. Скала: 10 µm. Квадрат са испрекиданом линијом означава велике, активиране, а нормалан квадрат означава хипогранулиране крвне плочице; стрелица означава присуство типичних гранулираних крвних плочица. (Б) Процент гранулираних, хипогранулираних и активираних крвних плочица. (В) Дијаметар крвних плочица. T0 означава почетак студије, T1 означава крај студије. Вредности су представљене као средње вредности и стандардна грешка. Статистички значајним су се сматрале вредности  $p < 0,05$ . (\*) Поређење са T0 периодом одговарајуће групе.

#### 4.7.3 Утицај пробиотске формулације на ниво фибриногена и *sP-selectin*

Слика 18 приказује средње вредности фибриногена (Слика 18А) и средње вредности *sP-selectin* (Слика 18Б) у обе групе, на почетку и на крају студије. Оно што се може уочити јесте да се концентрације анализираних параметара нису промениле унутар или између група. Када су се посматрале процентуалне промене (Слика 18В) фибриногена и *sP-selectin*, тренд пада вредности оба параметра био је присутан у интервентној групи у поређењу са контролном групом. У поређењу са фибриногеном ( $-4,86 \pm 7,81$ ), веће промене уочене су за вредности *sP-selectin* ( $-5,05 \pm 9,98$ ).



**Слика 18.** Промене вредности фибриногена и *sP-selectin*. (А) Концентрације фибриногена и (Б) Концентрације *sP-selectin* у контролној и интервентној групи, у T0 и T1 тачкама. (В) Процентуалне промене средњих вредности фибриногена и *sP-selectin* у контролној и интервентној групи. T0 означава почетак студије, T1 означава крај студије. Делта ( $\Delta$ ) вредност је израчуната према следећој формули:  $((T1/T0) - 1) \times 100$ . Вредности су представљене као средње вредности и стандардна грешка. Статистички значајним су се сматрале вредности  $p < 0,05$ .

#### 4.7.4 Корелације између ИТМ и хематолошких параметара

*Spearman* корелациони коефицијент одређен је за делта ( $\Delta$ ) вредности анализираних хематолошких параметара и ИТМ. Вредности корелационог параметра и њихова статистичка значајност приказани су у Табели 10. Статистички значајна негативна корелација уочена је између вредности  $\Delta$ ИТМ и  $\Delta$ PDW у интервентној групи ( $r = -0.5904$ ,  $p = 0,049$ ). Умерена негативна корелација постојала је између  $\Delta$ ИТМ и  $\Delta$ MCH ( $r = -0.452$ ,  $p = 0,067$ ), као и између  $\Delta$ ИТМ и  $\Delta$ MCHC ( $r = -0.522$ ,  $p = 0,071$ ). Другим речима, испитанице које су након интервенције имале нижи ИТМ, имале су веће вредности PDW које су скоро достигле референтне вредности. Иако не статистички значајно, сличан тренд примећен је и за MCH и MCHC вредности.

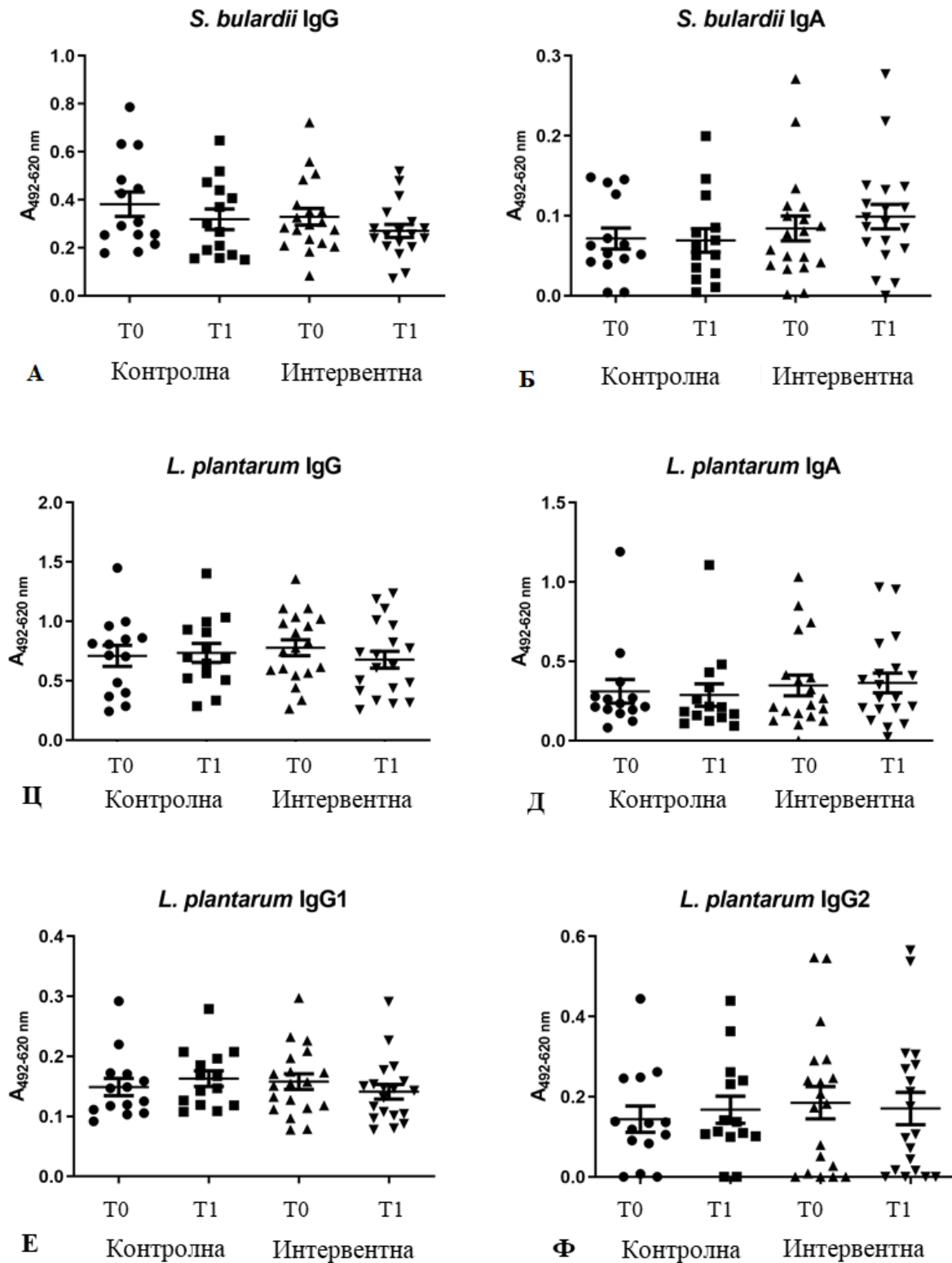
**Табела 10.** *Spearman* коефицијент корелације хематолошких параметара и ИТМ

Параметри	КГ		ИГ	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<b>RBC</b> (x10 <sup>12</sup> /L)	0,259	0,438	0,031	0,919
<b>Hgb</b> (g/L)	- 0,067	0,837	- 0,379	0,202
<b>HCT</b> (L/L)	0,059	0,865	- 0,236	0,437
<b>MCV</b> (fL)	- 0,358	0,251	- 0,357	0,232
<b>MCH</b> (pg)	0,023	0,951	- <b>0,528</b>	<b>0,067</b>
<b>MCHC</b> (g/L)	0,232	0,489	- <b>0,522</b>	<b>0,071</b>
<b>RDW</b> (%)	0,001	0,973	0,250	0,521
<b>PLT</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,210	0,533	0,442	0,116
<b>MPV</b> (fL)	- 0,133	0,678	- 0,147	0,646
<b>PCT</b> (%)	0,238	0,582	0,349	0,241
<b>PDW</b> (%)	0,232	0,489	<b>0,591</b>	<b>0,049</b>
<b>Fibrinogen</b> (g/L)	0,071	0,906	0,200	0,613
<b>P – selectin</b> (pg/mL)	0,025	0,958	0,035	0,890

#### 4.8 Утицај пробиотске формулације на одабране параметре хуморалног и целуларног имунитета

##### 4.8.1 Одређивање нивоа антитела специфичних на микроорганизме коришћене у студији

Анализом нивоа антимикуробних *IgG*, *IgG1*, *IgG2* и *IgA* антитела специфичних за *S. boulardii* и *L. plantarum 299v* нису уочене статистички значајне разлике између група, као ни током времена, Слика 19А, Б, Ц, Д, Е, Ф. Анализа нивоа поткласа *IgG* специфичних за са *S. boulardii* показала је да постоји везивање секундарних антитела за овај микроорганизам, те анализа није била успешна. С обзиром да разлике нису уочене на нивоу укупног *IgG* овај феномен није даље испитиван.

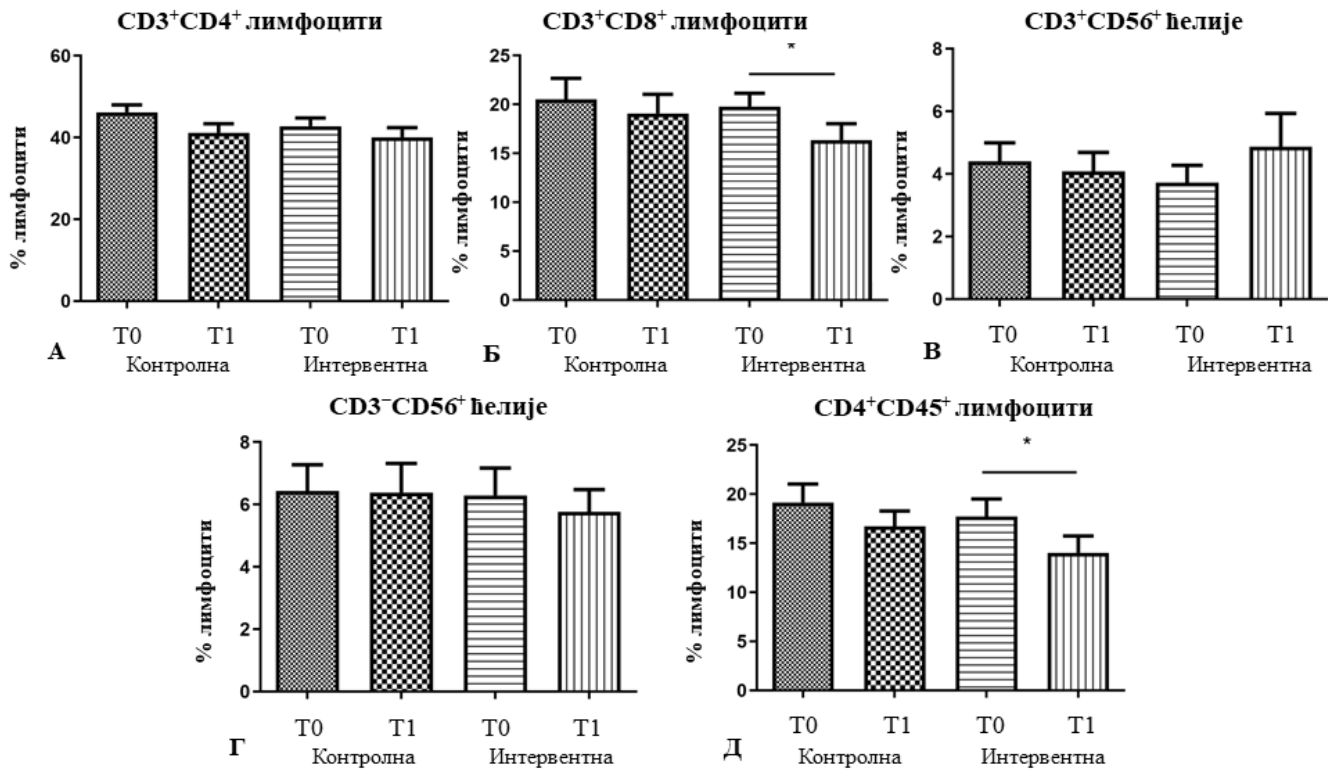


**Слика 19.** IgG антитела специфична за *S. boulardii* (А); IgA антитела специфична за *S. boulardii* (Б); IgG антитела специфична за *L. plantarum* 299v (Ц); IgA антитела специфична за *L. plantarum* 299v (Д); IgG1 антитела специфична за *L. plantarum* 299v (Е); IgG2 антитела специфична за *L. plantarum* 299v (Ф);

#### 4.8.2 Анализа субпопулација лимфоцита у периферној крви

Појединачни узорци из две тестиране популације анализирани су у две временске тачке, након флуоресцентног бојења, проточном цитометријом. Нису откривене значајне промене у процентима  $CD3^+CD4^+$  Т ћелијама између група, ни током времена унутар појединачних група, Слика 20А. Значајно смањење процента  $CD3^+CD8^+$  ћелија је откривено у интервентној групи у Т1 тачки ( $p = 0,043$ ), Слика 20Б.

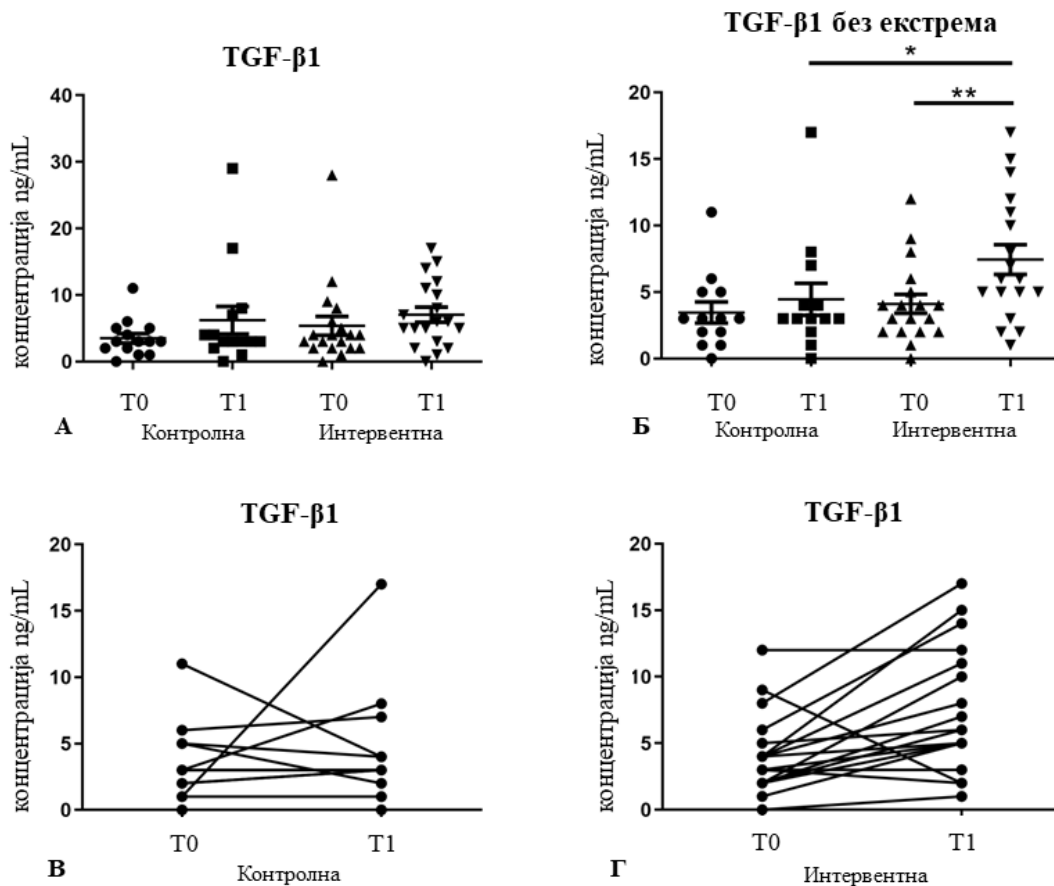
Нису откривене значајне промене између група при Т0, ни при Т1, у заступљености  $CD3^+CD56^+$  ћелија, а детектовано повећање ћелија у интервентној групи при Т1 није било значајно ( $p = 0,122$ ), Слика 20В. Заступљеност  $CD3^-CD56^+$  ћелија такође се није значајно разликовала између или унутар група у две временске тачке, слика 20Г. Нису откривене значајне промене у процентима  $CD4^+CD45^+$  лимфоцита између група при Т0, ни при Т1, али је значајно смањење нивоа  $CD4^+CD45^+$  лимфоцита откривено у интервентној групи при Т1 ( $p = 0,043$ ), Слика 20Д.



Слика 20. Процентуална заступљеност  $CD3^+CD4^+$  лимфоцита (А),  $CD3^+CD8^+$  лимфоцита (Б),  $CD3^+CD56^+$  ћелија (В),  $CD3^-CD56^+$  ћелија (Г) и  $CD4^+CD45^+$  лимфоцита (Д) унутар и између група након 12 недеља интервенције

### 4.8.3 Утицај суплементације на нивое $TGF-\beta 1$

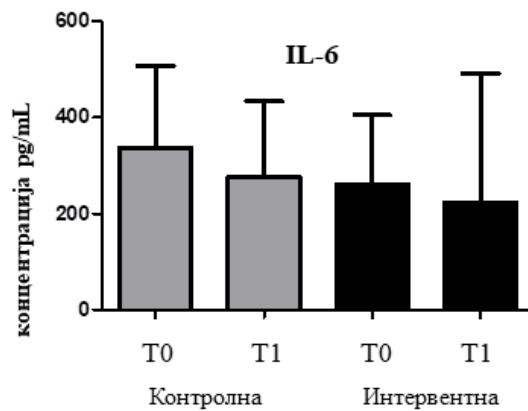
Укупни  $TGF-\beta 1$  је мерен директно из серума. Резултати на нивоу целих група нису показали нису показали статистички значајне разлике у *Kruskal – Wallis* тесту између група, као ни током времена ( $p = 0,135$ ), али је уочено да постоје две индивидуе, једна у плацебо групи и једна у интервентној групи код којих су нивои били изразито високи Слика 21А, и по њиховом изостављању јасно се види тренд пораста нивоа укупног  $TGF-\beta 1$  како у интервентној групи након интервенције, тако и између плацебо и интервентне групе у временској тачки Т1, Слика 21Б. Промена нивоа по групама током времена приказана је на Слици 21В И 21Г.



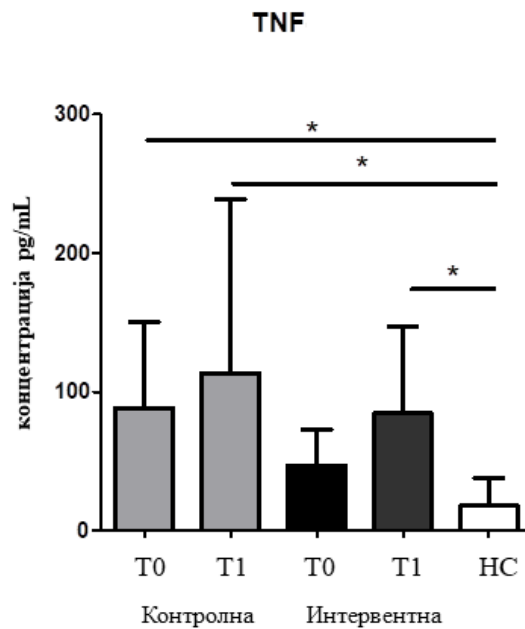
Слика 21. Концентрације  $TGF-\beta 1$  (ng/mL) са укљученим екстремним вредностима (А), са искљученим екстремним вредностима (Б) у контролној и интервентној групи у Т0 и Т1. Промене концентрација  $TGF-\beta 1$  (ng/mL) у контролној (В) и интервентној (Г) групи након интервенције.

#### 4.8.4 Утицај суплементације на секрецију цитокина након *in vitro* стимулације ћелија периферне крви

Прелиминарном анализом утврђено је да до значајне промене у концентрацијама одређиваних цитокина *TNF* и *IL-6*, у односу на нестимулисане ћелије дошло само приликом стимулације липополисахаридом, па је финална анализа рађена само из ових узорака. Није примећена значајна разлика у концентрацијама *IL-6* након стимулације ћелија периферне крви ЛПС, између група, као ни кроз време. Слика 22 приказује средње вредности са стандардним девијацијама. Концентрације *IL-6* нестимулисаних ћелија су биле немерљиве, те из тог разлога нису приказане. Такође, није примећена значајна разлика у концентрацијама *TNF* након стимулације ћелија периферне крви ЛПС-ом између група, као ни кроз време (Слика 23).



Слика 22. Концентрације *IL-6* након стимулације ћелија периферне крви липополисахаридом у контролној и интервентној групи пре почетка и након 12 недеља дијетарне интервенције



Слика 23. Концентрације *TNF* након стимулације ћелија периферне крви липополисахаридом у контролној и интервентној групи пре почетка и након 12 недеља дијетарне интервенције; НС-нестимулисане ћелије;

#### 4.9 Утицај пробиотске формулације на епигенетске маркере

У сврху испитивања утицаја нове пробиотске формулације на епигенетске маркере повезане са гојазношћу, испитана је експресија одређених *miRNA* (*miR-34a-5p*, *miR-155-5p*, *miR-125b-5p*, *miR-26b-5p*, *miR-126-3p* и *miR-24-3p*) и *mRNA* (*PDK4 mRNA*, *SIRT1 mRNA* и *TNF mRNA*). Експресија наведених *miRNA* и *mRNA* одређена је из капиларне крви на почетку и на крају студије (Табела 11).

На почетку студије, вредности испитиваних *miRNA* и *mRNA* нису се статистички значајно разликовале између контролне и интервентне групе. Три месеца суплементације резултовало је статистички значајним снижењем експресије *miR-155-5p* ( $p = 0,040$ ), *miR-125b-5p* ( $p = 0,049$ ) и *TNF mRNA* ( $p = 0,009$ ) у интервентној групи. Експресија *miR-26b-5p* је показала тренд снижења експресије ( $p = 0,067$ ). Суплементација новом пробиотском формулацијом није довела до промена у експресији *miR-126-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-24-3p*, *SIRT1*, и *PDK4*. Додатно, у поређењу са контролном групом, експресија *miR-155-5p* ( $p = 0,050$ ) и *miR-24-3p* ( $p = 0,031$ ) је била статистички значајно нижа у интервентној групи након суплементације. Експресија осталих испитиваних *miRNA* и *mRNA* није се статистички значајно разликовала између група. Добијени резултати приказани су у Табели 9, и представљени су као средња вредност и стандардна девијација. За статистичку обраду података кориштене су *MANOVA* и *ANOVA* анализе са поновљеним мерењима 2 x 2, како би се испитале разлике унутар и између група. Вредност *Partial Eta*<sup>2</sup> коришћена је како би се испитао ефекат суплементације на промене унутар и између група.

**Табела 11.** Промене  $\Delta Ct$  вредности *miRNA* и *mRNA* на почетку и након 12 недеља интервенције

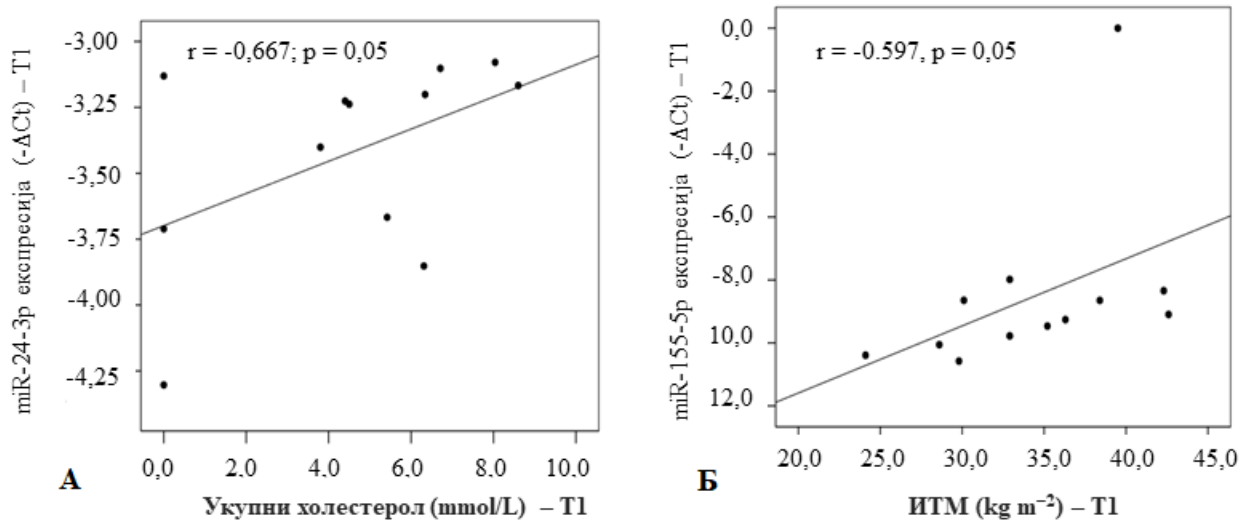
Параметар	T0		T1	
	Интервентна $\Delta Ct$	Контролна $\Delta Ct$	Интервентна $\Delta Ct$	Контролна $\Delta Ct$
<i>miR-34a-5p</i>	11,34 ± 1,20 $p = 0,889$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,002$	11,46 ± 1,55	11,97 ± 2,42 $p = 0,356$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,057$	11,01 ± 1,32
<i>miR-155-5p</i>	8,69 ± 1,31 $p = 0,425$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,036$	9,15 ± 1,13	9,30 ± 0,85* <b><math>p = 0,050</math></b> , Part. $\text{Eta}^2 = 0,205$	8,38 ± 1,06
<i>miR-125b-5p</i>	5,41 ± 1,18 $p = 0,068$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,173$	6,43 ± 1,11	5,99 ± 1,36* $p = 0,805$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,003$	5,85 ± 1,02
<i>miR-26b-5p</i>	1,51 ± 0,44 <b><math>p = 0,013</math></b> , Part. $\text{Eta}^2 = 0,295$	2,17 ± 0,63	1,84 ± 0,53 $p = 0,720$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,007$	1,92 ± 0,35
<i>miR-126-3p</i>	1,88 ± 0,56 $p = 0,059$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,184$	2,42 ± 0,60	2,26 ± 0,65 $p = 0,651$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,012$	2,13 ± 0,55*
<i>miR-24-3p</i>	3,13 ± 0,76 $p = 0,247$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,074$	3,63 ± 1,10	3,42 ± 0,38 <b><math>p = 0,031</math></b> , Part. $\text{Eta}^2 = 0,233$	2,71 ± 0,97
<i>PDK4</i>	11,2 ± 0,74 $p = 0,957$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,00$	11,18 ± 0,47	11,00 ± 0,67 $p = 0,916$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,001$	10,97 ± 0,58
<i>SIRT1</i>	10,10 ± 0,87 $p = 0,915$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,001$	10,12 ± 0,48	10,52 ± 0,63 $p = 0,635$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,014$	10,38 ± 0,52*
<i>TNF</i>	10,24 ± 1,66 $p = 0,754$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,007$	10,46 ± 0,94	11,36 ± 1,12* $p = 0,341$ , Part. $\text{Eta}^2 = 0,057$	10,89 ± 0,82

\* $p \leq 0,05$  – статистичка значајност унутар одговарајуће групе



#### 4.9.1 Испитивање корелација епигенетских маркера са антропометријским и липидним параметрима

Даља испитивања укључивала су проверу постојања корелација епигенетских маркера са антропометријским параметрима и вредностима маркера липидног статуса. Након три месеца, у интервентној групи уочена је позитивна корелација између експресије *miR-24-3p* и концентрација укупног холестерола ( $r = -0,667$ ,  $p = 0,05$ ), као и између експресије *miR-155-5p* и вредности ИТМ ( $r = -0,597$ ,  $p = 0,05$ ). Заправо, то значи да је код испитаница које су имале нижи ИТМ након интервенције била нижа и експресија *miR-155-5p*, док је код испитаница које су имале ниже вредности укупног холестерола била нижа и експресија *miR-24-3p* (Слика 24).



Слика 24. Корелације након интервенције: (А) Корелација између укупног холестерола (ТС, mmol/L) и експресије *miR24-3p* (-ΔCt). (Б) Корелација између ИТМ (kg/m<sup>2</sup>) и експресије *miR155-5p* (-ΔCt).

## 5 ДИСКУСИЈА

Циљ ове студије био је да се обезбеде нови докази синергистичког деловања пробиотика и поликозанола код гојазних особа са или без придружених коморбидитета, који ће пружити информације о могућности укључивања новог додатка исхрани у примарној и секундарној превенцији гојазности. Узимајући у обзир позитивну корелацију дисбиозе ГИ микробиоте са повећаним ИТМ и придруженим коморбидитетима, сматрали смо оправданим и потенцијално корисним испитивање утицаја пробиотика и октакозанола на метаболичке и друге параметре нарушене код гојазних особа. Прегледом доступне литературе може се закључити да је деловање пробиотика сој-специфично, али и зависно од дозе и дужине интервенције. Велики број студија, посебно анималних, се бавило испитивањем ефикасности пробиотика и октакозанола у третману одређених ГИ обољења. Међутим, оно што смо приметили јесте да недостају клиничке студије које би потврдиле досадашње резултате претклиничких студија, а према нашим сазнањима ово је једина студија која се бавила испитивањем утицаја комбинације пробиотика и октакозанола код гојазних особа.

С обзиром на присуство хроничне инфламације ниског степена код гојазних особа, предмет научног истраживања ове докторске дисертације био је процена ефикасности комбинације два пробиотска соја, *L. plantarum* 299v и *S. cerevisiae* var. *boulevardii*, са биолошки активним једињењем са хипохолестеролемијским ефектом (октакозанол) на метаболичке и имунолошке параметре код особа са ИТМ од 30 до 39,9 kg m<sup>-2</sup>. Такође, испитиван је и утицај на антропометријске параметре и ниво адипокина, а све у циљу проналажења новог додатка исхрани који би, уз промене животног стила, био адекватна нутритивна подршка у третману гојазности. Последњих година, истраживања су показала да су *miRNA*, мале некодирајуће молекуле рибонуклеинске киселине, значајни медијатори у интеракцији домаћина и микробиоте, те смо од посебног значаја сматрали испитати утицај нове пробиотске формулације на експресију епигенетских маркера повезаних са гојазношћу.

### 5.1 Утицај пробиотске формулације на антропометријске параметре

Резултати досадашњих студија које су проучавале ефекат пробиотика на ТМ су неусаглашени и зависни од врсте пробиотика. Неке од студија су пријавиле скроман ефекат пробиотика на губитак ТМ код особа са прекомерном ТМ и гојазних особа (134, 202), док су друге студије пријавиле да примена пробиотика нема утицај на ТМ или да чак примена неких *Lactobacillus* врста доводи до повећања ТМ (128, 203). Анималне студије су показале да је примена *Lactobacillus ingluviei*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. agilis* или *Ligilactobacillus salivarius* повезана са повећањем ТМ мишева, пацова, свиња и перади, док је примена *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* и *L. plantarum* повезана са губитком ТМ код гојазних пацова мишева (132, 203). Након анималних, многе клиничке студије су доказале да *Lactobacillus spp.* имају утицај на ТМ, а резултати су се углавном слагали са оним забележеним приликом анималних студија. Клиничке студије су доказале повезаност суплементације *L. reuteri*, *L. sakei*, *L. acidophilus* и *L. casei* са повећањем ТМ, док су *L. gasseri*, *L. amylovorus* и *L. plantarum* довели до губитка ТМ код гојазних особа, као и до смањења масе масног ткива код особа са прекомерном ТМ, као и код особа са нормалном ТМ (132). Такође, *S. bouvardii* (5 x 10<sup>9</sup> CFU) са супероксид-дизмутазом, два пута дневно, у комбинацији са рестриктивном дијетом доводи до значајног губитка ТМ код гојазних особа, након 60 дана суплементације (187). Резултати наше студије нису указали на значајност промене ТМ у поређењу са контролном групом. Резултати наше али и других студија указују на то да пробиотици првенствено утичу на

регулацију метаболичких параметара и параметара инфламације, уско повезаних са гојазношћу и коморбидитетима који прате гојазност.

## 5.2 Утицај пробиотске формулације на нивое метаболичких параметара

Како бисмо испитали утицај нове пробиотске формулације на промене липидног профила, одредили смо концентрације укупног холестерола, *LDL*-холестерола, *HDL*-холестерола и триглицерида, пре почетка студије, као и након 12 недеља дијетарне интервенције. У литератури је познато да *Lactobacillus* врсте/сојеви имају утицај на смањење концентрација холестерола и триглицерида, захваљујући деконјугацији жучних соли и продукцији *SCFA*, посебно пропионата (117, 119). Наиме, пропионати инхибирају синтезу масних киселина у јетри, на тај начин снижавајући концентрације *LDL*-холестерола и триглицерида у плазми (204). *Qiu* и сар. су установили да се повољан ефекат *Lactobacillus* сојева на концентрације укупног и *LDL*-холестерола код особа прекомерне ТМ и гојазних особа, остварује приликом примене високих доза пробиотика  $\geq 10^{10}$  CFU/дан у временском периоду од 12 недеља (117), што се слаже са дозама и дужином трајања наше студије. Осим тога, захваљујући способности ћелијског зида кваснице да апсорбује холестерол и индиректном утицају на ГИ микробиоту, *S. boulardii* има способност да регулише липидни профил у јетри и плазми (120). Такође, доза *S. boulardii* коришћена у овој студији, у претходним студијама је показала позитиван ефекат на здравље ГИТ (111). Резултати наше студије нису показали значајан ефекат на концентрације укупног и *LDL*-холестерола након 12 недеља примене пробиотика и октакозанола. Са друге стране, концентрације *HDL*-холестерола су значајно порасле у интервентној групи након дијетарне интервенције. Такође, након 12 недеља, у интервентној групи, уочен је опадајући тренд концентрација триглицерида. Према недавно спроведеној студији од стране *Zikou* и сар. пробиотици доводе до снижења концентрација триглицерида и укупног холестерола, те повишења концентрација *HDL*-холестерола, али без значајног утицаја на концентрације *LDL*-холестерол (205). Како бисмо појачали хипохолестеролемијски ефекат, пробиотска формулација садржи комбинацију пробиотика и биолошки активног једињења октакозанола. Хипохолестеролемијски ефекат октакозанола огледа се у ресорпције жучних киселина, као и смањењу активности *HMG-CoA*-редуктазе активацијом *AMP* киназе (188, 192, 206). Додатно, октакозанол утиче на повећање концентрација *HDL*-холестерола тако што инхибира холестерол естар трансферни протеин (енгл. *Cholesterol Ester Transfer Protein, CETP*) (207). Недавна спроведена мета-анализа показала је да примена поликозанола у просечној дневној дози од 12 mg (распон доза од 5 до 40 mg) значајно снижава концентрације *LDL*-холестерола, у просечном трајању интервенције 29,6 недеља (распон интервенција од 4 до 104 недеље) (208). У овој мета-анализи биле су укључене студије које су испитивале ефикасност поликозанола код особа са нормохолестеролемијом, али и код пацијената са хиперхолестеролемијом, хипертензијом и *diabetes mellitus* тип 2. Супротно резултатима наведене студије, *Patrocino* и сар. дошли су до закључка да поликозанол има корисне ефекте на концентрације укупног, *HDL* и *LDL*-холестерола код пацијената са дислипидемијом, али само приликом примене поликозанола у дози од 10 mg и трајању суплементације 8 недеља, без значајног ефекта на ниво триглицерида (206). Међутим, наведени ефекти нису постигнути при вишим дозама од 20 mg, без обзира на дужину трајања суплементације. У сврху наших истраживања, испитанице су примале високе дозе октакозанола, 40 mg, што би могло бити објашњење зашто након примене нове пробиотске формулације није дошло до снижења нивоа *LDL*-холестерола. Услед повећања концентрација *HDL*-холестерола, примена пробиотске формулације би се могла узети у обзир као ефикасна стратегија у превенцији настанка КВО и дијабетеса, обољења која су често удружена са гојазношћу (209).

Од посебног значаја било је испитати и ефекат пробиотске формулације на концентрације глукозе у крви, с обзиром на то да је гојазност веома често повезана са повећаном инциденцом оболевања од *diabetes mellitus* тип 2 (138). Додатно, промене у саставу ГИ микробиоте значајно доприносе повећању инциденце инсулинске резистенције, а самим тим и оболевања од *diabetes mellitus* тип 2 (210). Резултати наше студије показали су опадајући тренд концентрација глукозе и инсулина наташте у интервентној групи, након 12 недеља суплементације. На почетку студије, пре саме интервенције, вредности глукозе у крви испитаница интервентне групе биле су више од референтних вредности (211). Иако је статистичка значајност промене изостала, концентрације глукозе наташте у интервентној групи су постигле референтне вредности након дијетарне интервенције. Мета-анализа рандомизовано контролираних студија показала је да примена пробиотика код особа оболелих од ДМ тип 2 доводи до значајне редукације концентрација глукозе, гликозилираног хемоглобина и инсулина у крви (212). Интересантно је то да су *Sun* и сар. приметили да примена пробиотика има јачи ефекат на редукацију нивоа глукозе код дијабетичара него код особа са нормогликемијом (213). Аутори сматрају да су позитивне промене концентрација глукозе и инсулина последица поновног успостављања баланса ГИ флоре као резултат промене састава ГИ микробиоте након примене пробиотика, тако да је пораст ниво инсулина одложен или превениран. Анималне студије су показале способност *Lactobacillus* сојева да регулишу хипергликемију и инсулинску осетљивост, док клиничка студија са *L. plantarum HAC01* није потврдила корисне ефекте на регулацију глукозе код особа са предијабетесом (210).

### 5.3 Утицај пробиотске формулације на концентрације адипоцитокина

Гојазност је веома често удружена са хроничном инфламацијом ниског степена, што се огледа у повећању концентрација маркера системске инфламације, попут *TNF*, *IL-6* и *CRP* (27). Узимајући у обзир позитивне ефекте пробиотика на ТМ и клиничке параметре претходно уочене у анималним (214) и хуманим студијама (215, 216), одлучили смо да испитамо и ефекте пробиотске формулације на промене одређених проинфламаторних параметара. Масно ткиво представља динамичан ендокрини орган који на прекомеран унос хране одговара са инфламацијом ниског степена. Иницијални окидач за настанак инфламације у масном ткиву није до краја разјашњен, али се сматра да би то могла бити нека од нутритивних компоненти, метаболит или једињење који потиче из ГИТ (217). Сматра се да би примена пробиотика могла утицати на ослобађање цитокина и довести до побољшања имунолошког статуса домаћина, захваљујући антиинфламаторном ефекту ових микроорганизама (141). Наиме, код гојазних особа нарушен састав ГИ микробиоте доводи до нарушавања интегритета мукозне баријере и повећања оксидативног стреса, доводећи до појаве инфламације ниског степена и повећане продукције проинфламаторних протеина (135). Наиме, концентрације маркера инфламације попут *TNF*, *IL-6* и *CRP* су значајно више код гојазних у поређењу са особама нормалне телесне масе (218, 219). Сагласно са претходним сазнањима, вредности *CRP* у обе групе су указивале на инфламацију ниског степена (5,70 (3,48 – 8,05) mg/dL интервентна група; 4,00 (3,10 – 10,60) mg/dL контролна група) (220). Након 12 недеља дијетарне интервенције, концентрације *CRP* и *IL-6* у крви испитаница интервентне групе биле су значајно ниже у поређењу са концентрацијама измереним пре почетка наше студије. Такође, у поређењу са контролном групом, концентрације *CRP* након периода суплементације биле су значајно ниже у интервентној групи. *Nasiri* и сар. су показали да примена пробиотика (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *S. thermophilus*, *total viable count* (TVC):  $2 \times 10^{11}$  CFU), у комбинацији са изокалоријском дијетом доводи до значајног снижења концентрација *CRP* код особа са прекомерном ТМ (135). *Zarrati* и сар. су установили да концентрације *CRP* опадају значајно више у групи која је конзумирала пробиотски јогурт (*L.*

*acidophilus La5*, *Bifidobacterium* BB12, и *L. casei* DN001,  $1 \times 10^8$  CFU/g) него у групама у којима је конзумиран само јогурт или пробиотски јогурт у комбинацији са нискокалоријским режимом исхране (136). У обе споменуте студије, дијетарна интервенција је трајала 8 недеља. Упркос разлици у трајању студије, као и у различитим пробиотским сојевима који су коришћени за интервенцију, резултати наше студије потврдили су да пробиотска формулација може имати корисне ефекте на регулацију концентрација *CRP* чак и без дијетарне интервенције.

Повишене концентрације *CRP* могу бити узроковане и одређеним адипоцитокинима попут *IL-6* (137). Заправо, у претходним студијама потврђена је позитивна корелација између *IL-6* и *CRP* концентрација, као и њихова корелација са ИТМ у серуму гојазних особа (218). Постоје подаци који указују да је пол значајан фактор који утиче на инфламацију, с обзиром на то да су значајно више концентрације *IL-6* забележене код гојазних жена у односу на гојазне мушкарце (221). Управо као и концентрације *CRP*, концентрације *IL-6*, на почетку студије, биле су више од референтних вредности у обе групе, што представља додатну потврду постојања инфламације ниског степена гојазних испитаница. Након интервенције новом пробиотском формулацијом, резултати су указали на побољшање постојеће инфламације, односно да је дошло до смањења концентрација инфламаторних маркера попут *IL-6* и *CRP*. Иако су испитивана скупина били дијабетичари, литературни подаци указују на то да *Lactiplantibacillus* сојеви могу утицати на концентрације *IL-6* (138). Такође, анималне студије су показале значајно смањење концентрација проинфламаторних цитокина, попут *IL-6*, након третирања гојазних мишева/пацова пробиотским сојевима *L. plantarum*, *L. fermentum* или *L. casei* (140, 141). Додатно, *S. boulardii*, једна од компоненти пробиотске формулације, такође је довео до снижења концентрације *IL-6* у плазми гојазних и оболелих од *diabetes mellitus* типа 2 мишева (139). Управо ови подаци објашњавају регулацију концентрација *IL-6* уочених и код испитаница наше студије, што је вероватно допринело и снижењу концентрација *CRP* како је већ и описано (137). Иако смо у интервентној групи приметили пад у експресији *TNF*, након интервенције нисмо уочили снижење концентрација истоименог протеина. Наши резултати су у складу са резултатима студија које су спровели *Kopp* и сар. (више сојева рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, омега – 3 масне киселине и витамин Д, 8 недеља) и *Göbel* и сар. (*Lactobacillus salivarius*, 12 недеља), који такође након интервенције нису уочили статистички значајне промене у концентрацијама *TNF* (215, 216). Значајно снижење *TNF* концентрација након интервенције са пробиотским јогуртом је примећено, али само у комбинацији са нискокалоријском дијетом (136). Такође, нисмо успели доказати утицај нове пробиотске формулације на концентрације *IL-17*, значајног маркера инфламације код гојазних особа, а посебно жена (222). Међутим, анималне и хумане студије су показале да постоји потенцијални ефекат пробиотика на снижење концентрације *IL-17* (141, 142). Могуће објашњење за наше резултате проналазимо у томе да је сваки ефекат пробиотика сој-специфичан, и да се резултати претходно спроведених студија не могу екстраполарисати на пробиотску формулацију коришћену у тренутној студији. Осим тога, у хуманој студији у којој је доказан ефекат пробиотика на концентрације *IL-17*, као узорак су коришћене моноклеарне ћелије периферне крви, док смо ми за анализу користили узорке серума (142).

#### **5.4 Утицај пробиотске формулације на концентрације хормона који имају утицај на апетит**

Код гојазних особа су вредности неуроухуморалних медијатора који утичу на апетит, попут грелина, лептина и адипонектина, веома често промењене услед прекомерне масе масног ткива и присуства хроничне инфламације ниског степена (124, 223, 224). Постоје литературни подаци који, код гојазних особа, потврђују користан ефекат пробиотика на нивое хормона који

регулишу апетит (124). Апетит-регулишући хормон лептин, који се синтетише од стране масног ткива, везујући се за лептински рецептор у хипоталамусу, доводи до супримирања накупљања масног ткива, а самим тим и до редукције телесне масе (225). Наиме, повишене концентрације лептина примећене су у крви гојазних мишева и људи, што заправо представља лептинску резистенцију која значајно доприноси настанку метаболичких поремећаја (226). Наши резултати су показали тренд опадања концентрација лептина у интервентној групи, у поређењу са контролном групом. Слични резултати забележени су у студији која је подразумевала пацијенте са стабилном коронарном болешћу, након суплементације са *L. plantarum* 299v (227). Сматра се да пробиотици доводе до снижења концентрација лептина тако што смањују експресију *mRNA* лептина у хипоталамусу (223). Такође, анималне студије су показале суплементација *Lactobacillus* сојевима снижава експресију *PPAR-γ*, једног од главних регулатора адипогенезе, што последично доводи до смањене секреције лептина од стране масног ткива (223, 228, 229). Потребно је истакнути и да смо заједно са падом концентрација лептина, уочили и регулацију ниво грелина и *IL-6*, у смислу негативне корелације лептина и грелина, а позитивне корелације лептина и *IL-6*.

Насупрот лептину, концентрације адипонектина, адипокина који се такође синтетише од стране масног ткива, су снижене код особа са прекомерном телесном масом и код гојазних особа (230). Након интервенције са новом пробиотском формулацијом, нисмо уочили значајне промене у концентрацијама адипонектина унутар, као ни између група. Систематским прегледом клиничких студија које су укључивале особе са прекомерном телесном масом и гојазне особе, такође није уочен значајан ефекат пробиотика на концентрације адипонектина (230). Аутори сматрају да пробиотици не утичу на масно ткиво у толикој мери која би довела до промене концентрација адипонектина. Суплементација са *L. plantarum* 299v, сојем који је саставни дио пробиотске формулације коришћене у нашој студији, код пацијената са стабилном коронарном болешћу и ИТМ > 30 kg m<sup>-2</sup>, такође није довела до значајних промена у концентрацијама адипонектина (227). Управо као што су *Cabral* и сар. и ми можемо закључити да примена пробиотске формулације има минималне ефекте на нивое лептина и адипонектина код особа са прекомерном телесном масом и гојазних особа (124).

Грелин представља пептид који утиче на апетит а синтетише се у гастроинтестиналном тракту (231). Грелин се везује за грелински рецептор (енгл. *Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a, GSHR1a*), стимулише апетит, одржава енергетски баланс, регулише метаболизам глукозе и има утицај на појаву гојазности (232). Према подацима доступне литературе, ниво грелина је обрнуто пропорционалан телесној маси, а до пораста концентрација долази током изгладњавања и губитка телесне масе (233). *Shiia* и сар. су приметили да су концентрације грелина ниже код гојазних особа у поређењу са особама нормалне телесне масе (224). Резултати наше студије су показали да постоји ефекат интеракције на концентрације грелина, односно да концентрације грелина зависе и од третмана и дужине трајања интервенције. Након 12 недеља интервенције пробиотском формулацијом, концентрације грелина биле су значајно више у интервентној у поређењу са контролном групом. Могуће објашњење утицаја пробиотика на нивое грелина пронашли смо у студији спроведеној од стране *Schalla* и сар. (131). Резултати њихове студије су показали да суплементација са *B. lactis* V9 доводи до повећања концентрација грелина код жена са синдромом полицистичних јајника. Они сматрају да би овај ефекат могао бити последица утицаја пробиотика на раст *SCFA*-продукујућих чланова микробиоте, што узрокује појачану продукцију *SCFA*, које последично утичу на секрецију грелина путем *SCFA* рецептора на ентероендокриним ћелијама. Међутим, услед постојања различитости коришћених пробиотских сојева и дужине трајања интервенције литературно доступних студија,

дефинитиван закључак о утицају пробиотика на хормоне који регулишу апетит не може бити донесен.

## 5.5 Утицај пробиотске формулације на хематолошке параметре

Познато је да промене у телесној маси, поред биохемијских и метаболички параметара, значајно утичу и на хематолошке параметре, при чему повећање телесне масе доводи до повећања броја леукоцита, тромбоцита, али и повећане агрегације еритроцита (166, 234, 235). Резултати наше студије су показали да примена пробиотске формулације испољава одређене повољне ефекте на морфолошке и функционалне карактеристике еритроцита и тромбоцита код гојазних жена, без забележених нежељених ефеката.

Приликом анализе хематолошких параметара који су се односили на еритроците и тромбоците, уочили смо да два параметра везана за тромбоците имају вредности које су одступале од референтних. Вредности *MPV*, параметра који представља просечну величину тромбоцита и индикатора активности тромбоцита (236), у складу са до сада спроведеним студијама (237, 238), биле су повишене и код гојазних испитаница које су учествовале у нашој студији. Додатно, вредности *PDW*, параметра који представља меру анизоцитозе тромбоцита (варијација величине и облика), на почетку студије биле су ниже од референтних. Контроверзни резултати о вредностима *PDW* концентрација код гојазних особа: постоје резултати који указују на позитивну корелацију између *PDW* вредности и индикатора гојазности, док други нису уочили значајне промене *PDW* вредности код гојазних особа. Могуће објашњење за снижене вредности *PDW* код гојазних особа може бити присуство стања инфламације ниског степена код гојазних особа и повећани утршак великих тромбоцита (239-241). До недавно, ниским вредностима *PDW* није придаван значај, међутим нови радови показују да нису без значаја. Наиме, ниске вредности *PDW* (испод референтних вредности) су повезане са ниском стопом преживљавања и повишеним ризиком смртности код старијих особа (242). У интервентној групи, након дијетарне интервенције новом пробиотском формулацијом, *MPV* вредности су достигле референтне вредности, док су се вредности *PDW* значајно побољшале и скоро достигле референтне. Иако су познати бројни бенефити примене пробиотика код гојазних особа, према нашим сазнањима, наша студија је прва хумана студија која је указала на повољне ефекте пробиотика на хематолошке параметре.

Узимајући у обзир да су се вредности крвних параметара разликовале између група на почетку студије (Т0 контролна vs. Т0 интервентна), на крају студије промене крвних параметара представљене су као процентуалне промене. Наши резултати су показали да су највеће процентуалне промене уочене за вредности *RDW*, квантитативног параметра анизоцитозе (промене у величини и облику) еритроцита, достижући скоро статистички значајну промену у интервентној групи. Исте промене су уочене и за претходно споменути *PDW* параметар, карактеристичан за тромбоците. У претходним студијама уочене су промене *RDW* вредности код особа са МС и гојазношћу (167, 243-245). Након завршетка дијетарне интервенције, резултати наше студије показали су побољшање униформности величине и облика еритроцита у интервентној групи.

Претходно описане промене хематолошких параметара, одређене помоћу хематолошког анализатора, праћене су и морфолошким променама еритроцита и тромбоцита. Анализа крвних размаза показала је да интервенција са пробиотском формулацијом испољава повољне ефекте, и то на три нивоа: 1) величина и облик еритроцита постали су униформнији након дијетарне интервенције, што је праћено 2) повећаним присуством нормохромних еритроцита, као и 3) повећаним уделом гранулисаних тромбоцита, једне од главних морфолошких карактеристика

нестимулисаних тромбоцита (246). Узимајући у обзир све наведено, може се рећи да интервенција пробиотском формулацијом има позитиван утицај на величину и облик еритроцита и тромбоцита, као и на обојеност еритроцита.

Поред активације тромбоцита, као стање инфламације ниског степена, гојазност може да утиче на све стадијуме атеросклерозе. С обзиром на то да се гојазност сматра стањем са повећаном агрегацијом тромбоцита (246, 247), које је веома често праћено са повећаним вредностима фибриногена и *sP-selectin* (248-250), значајним смо сматрали испитати утицај и могуће промене вредности наведених параметара након интервенције пробиотском формулацијом. Супротно очекивањима, нисмо уочили повишене вредности фибриногена и *sP-selectin* код гојазних испитаница, оба параметра била су у оквиру референтних вредности. Могуће објашњење, бар за непромењене вредности *sP-selectin*, проналазимо у униформном липидном профилу испитаница, због позитивне асоцијације гојазности и *sP-selectin* са једне стране, и триглицерида и холестерола са друге стране (249, 251). Додатно, вредности фибриногена су биле на горњој граници референтних вредности.

Додатну спознају о важности примене пробиотика код гојазних жена пружиле су нам уочене корелације између хематолошких параметара и ИТМ. Наиме, *Spearman* корелационом анализом уочена је значајна негативна корелација између ИТМ и *PDW* у интервентној групи након завршене дијетарне интервенције. Ово додатно подупире наша сазнања да пробиотици имају позитиван ефекат на морфолошку униформност тромбоцита и да су код испитаница које су изгубиле више килограма тромбоцити били униформнији. Поред тога, иако без статистичке значајности, уочена је и умерена негативна корелација између ИТМ и садржаја (*MCH*) и концентрације (*MCHC*) хемоглобина у еритроцитима испитаница интервентне групе. Подаци из досадашњих студија, а који се тичу нивоа хемоглобина код особа прекомерне телесне масе, и даље остају контроверзни. Према подацима из доступне литературе, гојазност може бити повезана са ниским (252), али и са повишеним нивоима хемоглобина (253-255), у зависности од година и пола. Неколико студија је пријавило у серуму снижене вредности жељеза, *MCH* и *MCHC* вредности, док су вредности *RDW* биле снижене код гојазних особа (167, 243, 248). Иако промене вредности хемоглобина, *MCH* и *MCHC* након дијетарне интервенције нису постигле статистичку значајност, негативне корелације између ИТМ и *MCH* и *MCHC* су биле статистички значајне, те указују на то да је код испитаница које су имале нижи ИТМ дошло и до побољшања вредности *MCH* и *MCHC*. Додатно, ефекат пробиотске формулације на обојеност еритроцита може бити објашњен као последица позитивног ефекта *L. plantarum 299v* на нивое хемоглобина и гвожђа услед повећане интестиналне апсорпције гвожђа (256-259). Поред тога, *L. plantarum 299v* има и значајан антиоксидативни капацитет, као и утицај на снижење нивоа фибриноген и до сада већ споменутих проинфламаторних параметара (227, 260-263).

Такође, и остале две компоненте пробиотске формулације, *S. boulardii* и октакозанол, имају антиоксидативна својства (264, 265). Познато је да је повишен ИТМ у позитивном односу са вредностима маркера оксидативног стреса, али и да је код гојазних особа снижена експресија антиоксидативних одбрамбених ензима у ћелијама крви (266-268). Због тога, иако не до краја разјашњен, позитиван ефекат пробиотске формулације на хематолошке параметре може бити делом због побољшаног инфламаторног статуса, али и могућим утицајем на оксидативни статус испитаница. Познато је да октакозанол испољава инхибиторне ефекте на агрегацију тромбоцита (269), те се сматра да би будуће студије могле показати до сада непознате ефекте на њихову функцију.



## 5.6 Утицај пробиотске формулације на одабране параметре целуларног и хуморалног имунитета

### 5.6.1 Утицај пробиотске формулације на субпопулације лимфоцита у периферној крви

Заступљеност субпопулација Т-ћелија периферне крви су један од главних показатеља стања имунског система. Т-лимфоцити су одговорни за ћелијама посредован имунски одговор, а класификовани су у субпопулације у зависности од функције коју обављају, а што се може разликовати на основу протеина изражених на њиховој површини, нпр. присуство  $CD3$  протеина представља маркер зреле Т-ћелије. Зреле Т-ћелије се могу поделити у две главне субпопулације,  $CD4^+$  и  $CD8^+$ , у зависности који је од ова два протеина присутан на њиховој површини.  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцити се везују за *MHC II* молекуле и делују као помоћне ћелије инфламаторних Т-ћелија при одговору на егзогене антигене. Са друге стране  $CD3^+CD8^+$  Т-ћелије се везују за *MHC I* молекуле и имају улогу цитотоксичних Т-ћелија које испољавају цитотоксични одговор на ендogene антигене. Додатно, однос  $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$  представља значајан индекс имунитета једне индивидуе. Измењена ГИ микробиота може утицати на субпопулације Т-лимфоцита а самим тим и утицати на имунски одговор, што заправо представља и могућу везу пробиотика и њиховог имуномодулаторног деловања. Резултати наше студије су показали да примена пробиотске формулације доводи до смањења процента  $CD3^+CD8^+$  ћелија у интервентној групи, док утицај на проценат  $CD3^+CD4^+$  ћелија није био значајан ни у једној групи. Анимална студија је показала да примена *L. johnsonii BS15* има значајан утицај на присуство одређених субпопулација Т-лимфоцита у периферној крви експерименталних животиња (270). Наиме, примена *L. johnsonii BS15* значајно је повећала проценат  $CD3^+CD4^+$ , као и однос  $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ , док је проценат  $CD3^+CD8^+$  Т-лимфоцита био снижен. Друга анимална студија коју су спровели *Shi* и сар. такође је потврдила да пробиотици имају значајан утицај на проценат Т-ћелијских субпопулација (271). Тако је администрација *L. rhamnosus GG* проузроковала повећање концентрација  $CD3^+CD8^+$  ламине проприје, док је пад концентрација уочен у мезентеричним лимфоидним чворовима и Пајеровим плочама мишева. Резултати наше, као и претходно спроведених студија указују на то да пробиотици регулишу имунски одговор утицајем на заступљеност субпопулација Т-лимфоцита у периферној крви.

У интервентној групи смо након 12 недеља учили промене у проценту меморијских Т помоћничких ћелија,  $CD4^+CD45RO^+$ , када је уочено значајно смањење у односу на почетне вредности. Наведене промене су од изузетног значаја, узимајући у обзир то да је ова врста ћелија повезана са хроничном инфламацијом ниског степена која је присутна код гојазних особа (272). Такође, *Hernandez* и сар. су приметили повећан проценат  $CD4^+CD45RO^+$  ћелија у периферној крви гојазне деце млађе од 12 година (273). Аутори су указали и на значајну позитивну корелацију ове субпопулације Т-ћелија са концентрацијама *LDL*-холестерола. Меморијске Т-ћелије се производе као одговор на стимулацију одређеним антигеном, што у овом случају представљају слободне масне киселине присутне у повишеним концентрацијама код гојазних особа (274). *Rodríguez-López* и сар. су испитивали утицај дијететског приступа заустављања хипертензије (енгл. *Dietary Approaches to Stop Hypertension, DASH*) на антропометријске параметре и параметре целуларног имунитета код особа са прекомерном ТМ и гојазних особа. На самом почетку студије, аутори су учили да је проценат меморијских  $CD4^+CD45RO^+$  Т-ћелија значајно повишен код особа са прекомерном ТМ и особа са гојазношћу. Насупрот њиховим очекивањима, упркос губитку ТМ након дијетарне интервенције, није дошло до снижења концентрација ових меморијских ћелија. Управо супротно, након 8 недеља интервенције са *DASH* дијетом, проценат  $CD4^+CD45RO^+$  Т-ћелија је порастао (275). За разлику од наших резултата, студија на волонтерима нормалне ТМ и без обољења показала је да *L.*

*plantarum* 299v ( $10^{10}$  CFU/дан) повећава експресију *CD45RO* маркера на  $CD4^+$  Т-ћелијама, док је суплементација са *L. rhamnosus* довела до снижења експресије овог маркера на  $CD4^+$  Т-ћелијама (276). Међутим, интервенција је трајала значајно краће него током наше студије, само 5 недеља. Према претходним и сазнањима из наше студије, можемо рећи да пробиотска формулација представља потенцијални адјувантни третман, који би синергистички уз одређену дијету представљао адекватан приступ за регулацију ТМ и имунског одговора код гојазних особа.

$CD3^+CD56^+$  ћелије на својој површини експримирају протеине карактеристичне за Т-лимфоците ( $CD3^+$  маркер) и *NK*-ћелије ( $CD56^+$  маркер), тако да имају профил који одговара и Т-и *NK*-ћелијама, при чему имају улогу у функционисању и урођеног и стеченог имунитета (277). *NK*-ћелије чине 5 – 15% укупног броја леукоцита одраслих здравих особа, а фенотипски се карактеришу експресијом  $CD56^+$  на својој површини, али не и  $CD3^+$ . Стога се *NK*-ћелије обележавају и као  $CD3^-CD56^+$  ћелије. *Naujoks* и сар. су испитивањем повезаности ИТМ са функцијом и експресијом рецептора *NK*-ћелија, дошли до сазнања да гојазност значајно утиче на функционисање ових ћелија, те да би дисфункција *NK*-ћелија могла бити повезана са повећаном инциденцом оболевања од карцинома која се јавља код гојазних особа (278). Заправо, цитотоксична активност *NK*-ћелија код колоректалног карцинома је значајно снижена код гојазних особа. У наведеној студији приликом анализе периферних мононуклеарних ћелија крви, концентрације  $CD3^+CD56^+$  ћелија су биле значајно више код гојазних особа ( $ИТМ \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$ ) у поређењу са особама нормалне ТМ, док значајне промене нису уочене приликом поређења особа са прекомерном ТМ ( $ИТМ = 25,0 - 29,9 \text{ kg m}^{-2}$ ) са особама нормалне ТМ. Насупрот овим сазнањима, друга студија је показала да је број циркулишућих  $CD3^+CD56^+$  ћелија био значајно нижи код особа са ДМ тип 2 у поређењу са контролном групом. Такође, уочена је и дисфункција ових ћелија у смислу смањене дегранулације и продукције *IFN- $\gamma$*  и *TNF* (277). У нашој студији забележен је тренд раста броја циркулишућих  $CD3^+CD56^+$  ћелија у интервентној групи након дијетарне интервенције, међутим без статистичке значајности. Значајне промене унутар и између група нису уочене ни за вредности  $CD3^-CD56^+$  ћелија. Иако нисмо успели доказати ефекат пробиотске формулације на  $CD3^+CD56^+$  ћелије, постоје студије које истичу да бактерије млечне киселине имају позитиван ефекат на ћелијски имунитет. Заправо, суплементација *L. rhamnosus* HN001 или *B. lactis* HN019 код старијих особа повећала је активност  $CD56^+$  ћелија, а *ex vivo* су потврдиле и значајно бољу активност против канцерогених ћелија након суплементације пробиотицима (279). Позитиван ефекат *B. lactis* HN019 потврђен је и у другој клиничкој студији, где је конзумирањем нискомасног млека са овом пробиотском бактеријом резултовало побољшањем имунског одговора у смислу повећања активности полиморфонуклеарних и *NK*-ћелија код здравих одраслих особа (280). Са друге стране, *Seifert* и сар. нису уочили значајан ефекат пробиотика (*L. casei* *Shirota*) на експресију и функцију  $CD3^+CD56^+$  ћелија (281).

## 5.6.2 Утицај пробиотске формулације на концентрације *TGF- $\beta$ 1*

Прегледом досадашње литературе можемо рећи да постоје одређена неслагања у вези са вредношћу *TGF- $\beta$ 1* концентрација код гојазних особа. Наиме, пре скоро 30 година *Corica* и сар. су установили да су *TGF- $\beta$ 1* вредности значајно ниже код гојазних жена у поређењу са женама нормалне ТМ. *In vitro* студије су показале да *TGF- $\beta$ 1* инхибира диференцијацију адипоцита, те да снижене вредности код гојазних жена указују на значајност овог фактора раста у патогенези и настанку гојазности (282). Насупрот резултатима наведене студије, постоје студије које су уочиле повишене вредности *TGF- $\beta$ 1* код гојазних особа (283, 284), али и оне студије које нису уочиле корелацију између ИТМ и *TGF- $\beta$ 1* (285). Не постоји јасно објашњење зашто су уочени

различити ефекти гојазности на  $TGF-\beta 1$  вредности, али с обзиром да се латентни  $TGF-\beta 1$  налази у тромбоцитима и да се може ослобађати приликом процеса коагулације, те су вредности у плазми обично ниже од вредности у серуму, процес сакупљања и припреме узорак може утицати на ове вредности. Складно са нашим резултатима, постоје и друге студије које указују на то да примена пробиотика стимулише продукцију  $TGF-\beta$ . Наиме, *in vitro* студија је показала да *L. johnsonii* доводи до индукције  $TGF-\beta$  експресије у *CaCO-2* ћелијама, на тај начин доприносиће одржавању интегритета интестиналне епителне баријере (286). Такође, деловањем различитих сојева бактерија млечне киселине и бифидобактерија на епителне ћелије, забележена је повећана експресија *IL-10* и  $TGF-\beta$ , уз повећану продукцију *IgA* антитела (116). *In vivo* студија је показала да након оралне примене *L. gasseri* SBT2055 испољава имуномодулаторни ефекат управо због стимулације  $TGF-\beta$  експресије и активације *TLR-2* сигналних путева. Заправо, сматра се да пробиотици испољавају имуномодулаторни ефекат захваљујући повећаној продукцији  $TGF-\beta$  од стране ДТ, што надаље узрокује повећану конверзију Т-ћелија у регулаторне *Foxp3*<sup>+</sup> Т-рег ћелије (158). Такође, након оралне примене *L. plantarum* IS – 10506 код деце млађе од 2 године уочен је појачан хуморални имунски одговор, као и повећана концентрација  $TGF-\beta 1$  у плазми.  $TGF-\beta 1$  се сматра јаким имунским супресором који путем мајчиног млека има значајну протективну улогу од настанка некротизирајућег ентероколитиса (287).

### **5.6.3 Утицај суплементације на секрецију цитокина након *in vitro* стимулације ћелија периферне крви**

Након стимулације ћелија периферне крви различитим антигенима, у поређењу са нестимулисаним ћелијама, примећена је статистички значајно повећана продукција *IL-6* и *TNF* од стране ћелија периферне крви стимулираних липополисахаридним антигеном. Међутим, статистички значајне промене у продукцији *IL-6* и *TNF* између интервентне и контролне групе нису биле забележене. Овакав резултат је највероватније последица великих индивидуалних разлика које постоје између пацијената на овом нивоу, као и чињенице да су постојале разлике у броју стимулираних ћелија у оквиру ћелијске суспензије.

#### 5.6.4 Нивои антитела специфичних за пробиотске микроорганизме кориштене у студији

Имуноглобулин *G* антитела представљају једну од најзаступљених протеинских фракција у хуманом серуму, представљајући 10 – 20% плазма протеина. Постоји укупно пет имуноглобулинских класа, *IgM*, *IgD*, *IgG*, *IgA* и *IgE*. Имуноглобулин *G* класа се надаље дели на четири субкласе *IgG1*, *IgG2*, *IgG3* и *IgG4*, које се разликују према структури и функцији (288). Имуноглобулин *G1* представља најзаступљенију подкласу, коју Б – ћелије производе у одговору на протеинске антигене. Смањене вредности *IgG1* су виђене у различитим примарним и секундарним дефицитима антитела, које могу водити до смањених укупних *IgG* вредности (хипогамаглобулинемија). Дефицит *IgG1* антитела је веома често повезан са рекурентним инфекцијама. Имуноглобулин *G2* субкласа антитела се скоро па искључиво синтетишу као одговор на бактеријске антигене полисахаридне структуре. Дефицит ових антитела се повезује са повећаном инциденцом одређених бактеријских инфекција, а веома често је удружен и са дефицитом *IgG4* и/или *IgA1* и *IgA2*. Имуноглобулин *G3* антитела се углавном ослобађају као одговор на вирусну инфекцију, док неинфективни антигени попут алергена стимулишу производњу *IgG4* антитела (288). Као што смо претходно споменули, *IgA* антитела представљају главна антитела локалног мукозног имунитета, која стварају биолошку баријеру како би неутралисали и спречили продор патогених микроорганизама. Осим тога, циркулишућа *IgA* такође имају протективну функцију путем интеракција са специфичним рецепторима и медијаторима имунитета (289). Имуноглобулин *G* и *A* антитела заправо представљају меру отпорности организма на инфекцију, те је један од циљева наше студије био испитати утицај пробиотских микроорганизама на хуморални имунитет, односно да ли *L. plantarum 299v* и *S. boulardii* утичу на ослобађање специфичних *IgG*, *IgG1*, *IgG2* и *IgA* антитела.

Анималне студије указују на то да примена пробиотика, попут *B. subtilis*, *B. lactis*, *B. infantis* и *Bacillus velezensis* повећавају концентрације *IgG*, *IgM* и *IgA* антитела у серуму експерименталних животиња, доказујући на тај начин да пробиотици имају способност модулације имунског одговора. Суплементација *L. rhamnosus GG* довела је до повећања концентрација *IgG* антитела на ротавирус код мале деце са дијагнозом гастроентеритиса а позитивних на ротавирус (290). Познато је да *S. boulardii* доводи до повећања концентрација серумских *IgG* антитела на *Clostridium difficile* токсине А и Б, те да *L. plantarum 299v* повећава вредности серумских *IgA* антитела код аксеничних пацова, као и до повећаних вредности *IgG* и *IgA* антитела код телади (186). Михаличкова и сар. су открили да суплементација *Lactobacillus helveticus L10* код спортиста није довела до значајних разлика унутар интервентне групе, али да је довела до одржавања нивоа укупних *IgA* антитела, с обзиром на то да је у контролној групи забележен пад *IgA* антитела (291). У истој студији нису уочене значајне промене унутар, нити између група у нивоима *IgG* антитела. Аутори нису уочили промене специфичних *IgG* антитела против бактерија млечне киселине, али је уочен пад специфичних *IgA* антитела против *L. rhamnosus LA68* и *L. rhamnosus LB64* у интервентној групи. Слично наведеној студији, ни у нашој нису уочене значајне промене у нивоима специфичних *IgG*, *IgG1*, *IgG2* и *IgA* антитела против *L. plantarum 299v* и *S. boulardii*, нити у интервентној нити у контролној групи. Насупрот очекиваном, нисмо успели доказати да пробиотски микроорганизми коришћени у нашој студији имају способност модулације хуморалног имунитета и могло би се рећи да је и то повољан исход, јер орална имунизација пробиотским сојевима заправо није пожељна.

## 5.7 Утицај пробиотске формулације на епигенетске маркере

Последњих година, истраживања су показала да су *microRNA* (*miRNA*), мале некодирајуће молекуле рибонуклеинске киселине (*RNK*), значајни медијатори у интеракцији домаћина и микробиоте, а тиме и један од могућих механизма преко којих пробиотици могу испољити своје ефекте. Одређене *miRNA* су различито заступљене у масном ткиву гојазних у поређењу са масним ткивом особа нормалне ТМ. Заправо, експресија одређених *miRNA* показују значајну корелацију са метаболичким параметрима попут ИТМ, адипогенезе, гликемије и нивоа лептина у крви (45). узимајући у обзир наведено, један од циљева наше студије био је одредити утицај нове пробиотске формулације на одређене епигенетске маркере специфичне за одређена метаболичка и инфламаторна стања.

Познато је да се гојазност сматра хроничним инфламаторним стањем ниског степена, где макрофаги играју главну улогу у продукцији проинфламаторних цитокина, али и одређених *miRNA* повезаних са инфламацијом. Повишене плазма вредности *miR-155* уочене су код одређених оболења, попут *diabetes mellitus* типа 2, МС, гојазности, атеросклерозе, карцинома и инфламаторне болести црева (292-294). *Karkeni* и сар. су показали да су концентрације *miR-155* значајно повишене у субкутаном адипозном ткиву гојазних особа у поређењу са особама нормалне телесне масе (292). Такође, аутори су приметили да *TNF*, као проинфламаторно једињење, промовише експресију *miR-155* у хуманим адипоцитима путем нуклеарног фактора *κB* (*NF-κB*). Осим повишене експресије *miR-155* у адипоцитима, *Trygstad* и сар. установили су повишену експресију *miR-155* и у узорцима крви гојазних особа у поређењу са особама нормалне телесне масе (295). С обзиром на растући број доказа који указују на то да пробиотици имају одређену улогу у модулацији инфламаторног одговора тако што утичу на експресију *miRNA*, управо је утицај пробиотика на експресију *miRNA-155* био од посебног интереса за испитати. Резултати анималне студије показали су да суплементација пробиотицима (*L. fermentum* *CECT5716*, *Lactobacillus salivarius* *CECT5713*, *Escherichia coli* *Nissle 1917*, *Saccharomyces boulardii* *CNCMI-745*) смањењем експресије *miRNA-155* испољавају значајан антиинфламаторни ефекат код мишева оболелих од инфламаторне болести црева (296). Додатно, испитивајући повезаност нарушене ГИТ микробиоте и колоректалног карцинома, дошло се до закључка да примена пробиотика (*L. acidophilus* и *B. bifidum*) снижава експресију *miR-155* и њеног циљног *KRAS* гена, сугеришући значајну улогу пробиотика у експресији ове онкогене *miRNA* (179). Према досадашњим сазнањима, наша истраживања представљају прву студију која је изучавала ефекат пробиотске формулације на експресију *miR-155* код гојазних особа. Суплементација новом пробиотском формулацијом резултовала је значајно нижом експресијом *miR-155* у интервентној у поређењу са контролном групом. Наведени резултати указују на то да пробиотска формулација кориштена у овој студији има потенцијални антиинфламаторни ефекат. *MicroRNA-155* експресија је такође повишена и код синдрома полицистичних јајника, ендокриног обољења које погађа 6 – 20% жена у репродуктивном периоду (297, 298). Жене са *PCOS* такође имају повишену инциденцу прекомерне телесне масе и гојазности. Узимајући у обзир да пробиотици имају способност да регулишу метаболичке параметре, хормонални профил, параметре инфламације код жена оболелих од *PCOS*, али и резултате наше студије, пробиотици имају велики потенцијал да буду укључени као помоћна терапија за *PCOS* (299). Додатно, наша испитивања су показала значајну корелацију између *miR-155* експресије и вредности ИТМ, што додатно потврђује улогу *miR-155* у гојазности и стања повезаних са гојазношћу.

*MicroRNA-34a* представља другу *miRNA* чије су вредности у адипоцитима гојазних особа повишене (300). Наиме, повишене вредности *miR-34a* инхибирају тамњење масног ткива, због чега се ова *miRNA* и сматра инхибитором настанка беж и смеђег масног ткива. Аутори су

показали да смањењем нивоа *miR-34a* долази до повећања маркера беж и смеђег масног ткива код гојазних мишева, што је последично довело до тамњења масног ткива и губитка телесне масе. Поред тога, *miR-34a* има значајну улогу у синтези инсулина, одржавању хомеостазе глукозе, као и у инциденци настанка ДМ тип 2 (301, 302). У нашој студији нисмо успели доказати ефекат пробиотске формулације на експресију *miR-34a*, као што нисмо успели пронаћи ни друге студије које су испитивале утицај пробиотика на експресију ове *miRNA*. Управо због њене повезаности са адипогенезом, додатне студије су потребне како би се испитала потенцијална повезаност примене пробиотика и процеса тамњења масног ткива, а самим тим и потенцијална употреба пробиотика у третману гојазности.

Од посебног интереса било је одредити ефекат нове пробиотске формулације на експресију *miR-24*, која је високо присутна у хепатоцитима и има значајну улогу у функцијама адипозног ткива, попут липолизе, инсулинске осетљивости, те метаболизму глукозе и липида (303, 304). Инсулином-индукован ген (енгл. *Insulin – Induced gene 1, Insig1*), са улогом инхибитора липогенезе, сматра се битним местом деловања *miR-24*, која инхибицијом овог гена узрокује хиперлипидемију и повећану акумулацију липида у јетри (303). Нивои *miR-24* повећани су у абдоминалном масном ткиву гојазних особа и особа оболелих од ДМ тип 2 (304). Додатно, *miR-24* је високо експримирана код гојазне деце, због чега се сматра да има важну улогу у настанку и развоју гојазности у детињству (305). Према резултатима наше студије, 12-недељна суплементација пробиотском формулацијом резултовала је значајно мањом експресијом *miR-24-3p* у крви, чиме је показан потенцијал ове формулације у третману гојазности и дијабетеса. Ова сазнања заслужују посебну пажњу и додатно истраживање, јер би пробиотска формулација, захваљујући малом броју нежељених ефеката и потенцијалног корисног деловања, могла имати значајну примену и у третману гојазности код деце. Додатно, уочили смо значајну корелацију између *miR-24-3p* експресије и вредности укупног холестерола. Наиме, испитанице које су на крају интервентног периода имале мању експресију *miR-24-3p*, имале су такође и ниже вредности укупног холестерола у крви. Ово сазнање је од посебног значаја, с обзиром на то да су нивои *miR-24-3p* значајно повишени код особа са породичном хиперхолестеролемијом и хиперлипидемијом повезаном са гојазношћу код гојазних мишева (306).

Позната је репресивна улога *miR-125b-5p* у адипогенези, с обзиром на то да је њена експресија смањена код гојазних особа (307). Студија коју су спровели *Rockstroh* и сар. идентификовала је матриксну металопроотеиназу 11 (*MMP11*) као циљно место деловања *miR-125b-5p* (308), ензима који се сматра негативним регулатором адипогенезе. Литературни подаци указују на то да *miR-125b-5p* смањује акумулацију триглицерида у адипоцитима, али и да прекомерна експресија *miR-125b-5p* у преадипоцитима има значајну протективну улогу у оксидативном стресу (309). *Ortega* и сар. су показали да хируршки индукован губитак ТМ утиче на вредности *miRNA* код морбидно гојазних особа, доводећи до значајног смањења *miR-125b-5p* вредности (310). У нашој студији, након 12 недеља суплементације, дошло је до значајног смањења експресије *miR-125b-5p* у интервентној групи. Значајне промене нису уочене између интервентне и контролне групе након периода суплементације. *In vitro* студија на периферним мононуклеарним ћелијама особа са дијагнозом лупуса, показала је да суплементација пробиотицима *L. rhamnosus* и *L. delbrueckii* доводи до повећане експресије *miR-125b-5p* (180). Иако се наведена студија не односи на ћелије гојазних особа, значајно је истакнути постигнути ефекат с обзиром на то да је имунски одговор нарушен код гојазних особа. Према доступним литературним подацима, не постоји хумана студија која се бавила испитивањем утицаја пробиотика на експресију *miR-125b-5p* код гојазних особа, због чега наведени резултати наше студије захтевају даља истраживања и потврду.

Досадашња истраживања указују на то да *miRNA-126-3p* испољава антиинфламаторни ефекат (311), имајући значајну улогу у одржавању ендотелијалне функције тако што повећава ендотелијалну пролиферацију и испољава атеропротективно деловање (312). *Schober* и сар. су идентификовали инхибицију *Delta like 1 homolog (Dlk1)* као примарни механизам деловања *miR-126-3p* (312). *Wang* и сар. су испитивали ефекат физичке активности и дијетарне интервенције на експресију *miRNA* пивоталних за ендотелну функцију (176). Студија је спроведена код гојазних особа, с обзиром да је гојазност веома често повезана са кардиоваскуларним обољењима. Резултати су показали да се ниво *miR-126* значајно повећао након физичке и дијетарне интервенције, доводећи и до побољшања ендотелне функције. Наша истраживања су показала тренд снижења експресије *miR-126-3p* након 12 недеља суплементације у интервентној групи, међутим без статистичке значајности. Насупрот очекивањима, повећана експресија је уочена у контролној групи. Могуће објашњење налазимо у томе да контролна група није примала пробиотик и да је инфламација ниског степена специфична за гојазне особе била виша у контролној него у интервентној групи. С обзиром да подаци указују да је експресија *miR-126-3p* повећана код особа са инфламаторним обољењем црева (313), где је ГИ микробиота нарушена, интервенција пробиотиком у нашој студији је вероватно побољшала стање ГИ микробиоте и превенирала промене у експресији *miR-126-3p*.

*MicroRNA-26* фамилија (*miR-26a-1*, *miR-26a-2* и *miR-26b*) представља *miRNA* фамилију која има значајну улогу у многим физиолошким функцијама, попут диференцијације неурона, расту и развоју мишића, хепатичком метаболизму липида и глукозе (314-316). Смањена експресија *miR-26b* у висцералном адипозном ткиву сматра се једним од узрочника гојазношћу индуковане инсулинске резистенције, и то инхибицијом *PTEN/PI3K/AKT* пута (317). Додатно, снижени нивои *miR-26a* пронађени су у јетри гојазних мишева и особа са прекомерном телесном масом (318). Недавна *in vivo* студија је показала да губитак *miR-26* фамилије може проузроковати експанзију адипозног ткива, доказујући тиме улогу ове фамилије у адипогенези (319). Такође, показали су да прогениторске ћелија адипоцита представљају примарно место деловања *miR-26* приликом регулације метаболизма масти. Заправо, повишени нивои *miR-26* у прогениторским ћелијама адипоцита блокирају повећање телесне масе, пролиферацију адипоцита, као и настанак хипергликемије и липидемије услед хиперкалоријске дијете. Значајност *miR-26* као медијатора у регулацији гојазношћу узроковане инсулинске резистенције и инфламације, потврдили су и *Xu* и сар. који су дошли до сазнања да *TNF*, лептин и рзистин смањују експресију *miR-26* у адипоцитима (320). Нажалост, у нашој студији статистички значајне промене нису детектоване унутар групе, нити између група.

*Sirtuin 1* представља једног од седам чланова *Sirtuin* фамилије (*SIRT1-7*) никотинамид аденин динуклеотид ( $NAD^+$ ) – зависне деацетилазе хистона. *SIRT1* има значајну улогу у метаболизму глукозе и липида. Његова повећана активност стимулише глуконеогенезу и секрецију инсулина, на тај начин доприносећи одржавању хомеостазе глукозе. Сматра се да *SIRT1* инхибира процес адипогенезе тако што супримира активност *PPAR- $\gamma$* , једног од главних регулатора адипогенезе (321). Анималне студије су показале да *SIRT1* има улогу медијатора у испољавању корисних ефеката пробиотика код гојазних мишева (322). *Khalili* и сар. су показали да је двомесечна суплементација *L. casei* довела до значајног губитка телесне масе и повећања експресије *SIRT1* код особа са *diabetes mellitus* типа 2 (323). Наши резултати нису показали значајан ефекат пробиотске формулације на експресију *SIRT1*, док је у контролној групи дошло до пада експресије *SIRT1*. Могуће објашњење проналазимо у томе да захваљујући позитивним ефектима пробиотика на ГИ микробиоту у интервентној групи није дошло до пада експресије *SIRT1*, што је заправо и подржано литературним подацима који говоре да је код особа са

нарушеном цревном микробиотом значајно смањен и ниво *SIRT1* у поређењу са здравим особама (324).

Током раних деведесетих година прошлог века, *Hotamisligil* и сар. приметили су да је у масном ткиву гојазних особа значајно повећана експресија *TNF mRNA*, као и концентрације истоименог протеина (28). Студија је додатно установила позитивну корелацију између експресије *TNF* и хиперинсулинемије, тиме сугеришући значајну улогу *TNF* у појави инсулинске резистенције повезане са гојазношћу. Захваљујући доступној литератури постало је јасно да инфламација има значајан утицај у патогенези инсулинске резистенције и гојазности. Управо, *TNF* се сматра главним медијатором између гојазношћу узроковане инфламације и инсулинске резистенције (325). Резултати наше студије показали су да суплементација новом пробиотском формулацијом доводи до смањења експресије *TNF* у интервентној групи. Иако је, у поређењу са контролном групом, у интервентној групи примећена смањена експресија *TNF*, разлика није постигла статистичку значајност. Анималне студије су установиле да примена пробиотика може довести до регулисања експресије/секреције *TNF*, а тиме и утицати на имунски одговор гојазних мишева (326, 327). На основу наших резултата можемо установити да примена пробиотске формулације може редуковати експресију/синтезу *TNF* и повољно утицати на инфламаторни статус гојазних особа, и то захваљујући благотворном утицају на ГИ микробиоту. Захваљујући досадашњим сазнањима, управо би путеви активације *TNF* могли представљати примарно место антиинфламаторног деловања пробиотика.

Утицај нове пробиотске формулације испитали смо и на експресију пируват дехидорегеназе киназе 4 (енгл. *Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4, PDK4*), која представља главног регулатора активности пируват дехидрогеназа комплекса (*PDC*), веома важног контролора оксидације глукозе (328). *PDK4* вредности су повишене код гојазних особа и особа оболелих од *diabetes mellitus*-а, али и током стања гладовања (328-330). Истраживања су показала да губитак телесне масе након баријатријске операције доводи до смањене експресије *PDK4* (330). Наши резултати нису показали ефекат пробиотске формулације на експресију *PDK4* код гојазних жена. Такође, у доступној литератури не постоје подаци који би указали на утицај пробиотика на експресију *PDK4*.



## 6 ЗАКЉУЧЦИ

Према постављеним циљевима, а на основу резултата представљених у овој студији, могу се извести следећи закључци:

1. Иако је након 12 недеља у обе групе дошло до губитка ТМ, разлике између контролне и интервентне групе нису биле значајне, те можемо рећи да нова пробиотска формулација првенствено делује на инфламаторне и метаболичке параметре гојазних особа, без значајног ефекта на промене у ТМ.
2. Суплементација комбинацијом *L. plantarum 299v*, *S. boulardii* и октакозанола је након 12 недеља показала значајан ефекат на повећање *HDL*-холестерола у крви. Насупрот очекиваном, спроведена дијетарна интервенција, није имала ефекат на вредности укупног холестерола и *LDL*-холестерола.
3. Потенцијални ефекат пробиотске формулације на концентрације метаболичких параметара попут триглицерида, глукозе и инсулина захтева додатна испитивања, али се може рећи да ова формулација има позитиван ефекат на липидни статус, с обзиром на већ споменути ефекат суплементације на концентрације кардиопротективног *HDL*-холестерола.
4. Анализом промене гликемијских параметара, попут концентрације инсулина и глукозе, уочен је тренд пада концентрација оба параметра у интервентној групи, међутим без статистички значајног ефекта.
5. Значајно је да је у интервентној групи након 12 недеља суплементације дошло до повећања концентрација грелина, хормона чије су вредности снижене код гојазних особа. Додатно, резултати су показали да је овај ефекат значајно завистан од третмана и дужине интервенције. Суплементација пробиотском формулацијом није испољила значајне ефекте на концентрације других хормона који регулишу апетит, попут адипонектина и лептина. У складу са другим студијама можемо рећи да пробиотици имају минималан ефекат на концентрације хормона који регулишу апетит, те да дефинитиван закључак не може бити донесен.
6. Суплементација дефинисаном пробиотском формулацијом имала је значајан ефекат на снижење концентрација *CRP*-а и *IL-6*, па можемо констатовати њен антиинфламаторни потенцијал. Снижење концентрација проинфламаторних параметара је од великог значаја, с обзиром на то да је код гојазних особа присутно стање хроничне инфламације ниског степена.
7. Испитивањем промена хематолошких параметара, након суплементације новом пробиотском формулацијом установљен је позитиван ефекат на величину и облик еритроцита, као и повећано присуство нормохромних еритроцита што се може приписати литературним подацима који описују позитиван ефекат *L. plantarum 299v* на интестиналну апсорпцију гвожђа.
8. Примена дефинисане пробиотске формулације је довела до повећаног боја гранулираних тромбоцита, који представљају један од главних морфолошких карактеристика нестимулисаних тромбоцита. Уочена је негативна корелација између ИТМ и *PDW* вредности у интервентној групи, односно да су испитанице које су након интервенције

изгубиле више килограма имале униформније тромбоците. Вредности фибриногена и *sP-selectin* су биле у референтном оквиру на почетку и на крају студије у обе групе. Значајан ефекат пробиотика на вредности фибриногена и *sP-selectin* није уочен.

9. Након 12 недеља забележен је ефекат интервенције пробиотском формулацијом на заступљеност субпопулација Т-лимфоцита у периферној крви, који се огледа у смањеном проценту цитотоксичних  $CD3^+CD8^+$  Т-ћелија. Утицај пробиотске формулације на број  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцита није забележен. У интервентној групи је након 12 недеља смањен проценат и  $CD4^+CD45RO^+$  меморијских Т-помоћничких ћелија које су повезане са хроничном инфламацијом ниског степена.
10. Значајан ефекат пробиотске формулације на параметре урођеног имунског одговора није забележен. Након дијетарне интервенције није уочена промена у вредностима *NK*-ћелија ( $CD3^-CD56^+$ ), док је тренд растан забележен за вредности  $CD3^+CD56^+$  ћелија, што захтева даља испитивања и потврду.
11. Дијетарна интервенција је резултовала повећаним концентрацијама *TGF-β1*, параметра који има значајну улогу у процесима адипогенезе, као и у супримирању имунског одговора.
12. Промене у нивоима специфичних *IgG*, *IgG1*, *IgG2* и *IgA* антитела против *L. plantarum* 299v и *S. boulardii*, пробиотских сојева коришћених у нашој студији, нису забележене ни у контролној нити у интервентној групи. Иако постоје студије које указују на то да наведени сојеви имају утицај на продукцију специфичних антитела, ми нисмо успели доказати да пробиотски микроорганизми врше модулацију хуморалног имунитета.
13. Суплементације наведеном пробиотском формулацијом резултовало је променама експресије одређених епигенетских маркера. Након дијетарне интервенције дошло је до снижења експресије проинфламаторне *miR-155-5p*, али и *TNF mRNA* у интервентној групи, на основу чега се може закључити да пробиотици и утицајем на епигенетске маркере могу остварити антиинфламаторни ефекат. Такође, примена нове пробиотске формулације резултовала је смањеном експресијом *miR-125b-5p*, повишене код гојазних особа, са значајном улогом у процесима адипогенезе. Додатно, експресија *miR-155-5p* и *miR-24-3p* била је значајно нижа након суплементације наведеном пробиотском формулацијом. Нова пробиотска формулација није довела до промена у експресији *miR-126-3p*, *miR-34a-5p*, *SIRT1* и *PDK4*. На основу остварених ефеката пробиотске формулације на епигенетске маркере, може се рећи да пробиотици захваљујући утицају на експресију *miRNA* и *mRNA*, остварују индиректан ефекат и на процесе адипогенезе и инфламаторног одговора.
14. Суплементација новом пробиотском формулацијом код испитаница које су имале нижи ИТМ довела је и до редукције у експресији *miR-155-5p*, док је код испитаница које су након суплементације имале ниже концентрације укупног холестерола уочена и редукована експресија *miR-24-3p*.

## 7 ЛИТЕРАТУРА

1. Organization WH. Obesity and Overweight. Newsroom. 2019.
2. Organization WH. Regional Office for Europe. WHO European Regional Obesity Report 2022. World Health Organization Regional Office for Europe. 2022.
3. Organization WH. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation. 2011.
4. Oussaada SM, Van Galen KA, Coومان MI, Kleinendorst L, Hazebroek EJ, van Haelst MM, et al. The pathogenesis of obesity. *Metabolism*. 2019;92:26-36.
5. Lutter M, Nestler EJ. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *The Journal of nutrition*. 2009;139(3):629-32.
6. Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2010;97(1):84-91.
7. Hesse S, van de Giessen E, Zientek F, Petroff D, Winter K, Dickson JC, et al. Association of central serotonin transporter availability and body mass index in healthy Europeans. *European Neuropsychopharmacology*. 2014;24(8):1240-7.
8. Blum K, Thanos PK, Gold MS. Dopamine and glucose, obesity, and reward deficiency syndrome. *Frontiers in psychology*. 2014;5:103904.
9. Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006;361(1471):1187-209.
10. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001;50(4):707-9.
11. Zhang Y, Liu J, Yao J, Ji G, Qian L, Wang J, et al. Obesity: pathophysiology and intervention. *Nutrients*. 2014;6(11):5153-83.
12. Lean M, Malkova D. Altered gut and adipose tissue hormones in overweight and obese individuals: cause or consequence? *International journal of obesity*. 2016;40(4):622-32.
13. Perry B, Wang Y. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutrition & diabetes*. 2012;2(1):e26-e.
14. Maffei C, Manfredi R, Trombetta M, Sordelli S, Storti M, Benuzzi T, et al. Insulin sensitivity is correlated with subcutaneous but not visceral body fat in overweight and obese prepubertal children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(6):2122-8.
15. Björntorp P, editor Obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus. Kongress: gehalten zu Wiesbaden vom 26 bis 30 April 1987; 1987: Springer.
16. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*. 2007;21(12):1443-55.
17. de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical chemistry*. 2008;54(6):945-55.
18. Bray GA, Kim K-K, Wilding JP, Federation WO. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obesity reviews*. 2017;18(7):715-23.
19. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. 2009;241-50.
20. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte Jr D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature medicine*. 1996;2(5):589-93.

21. Arora S. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity—a review. *Neuropeptides*. 2006;40(6):375-401.
22. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature medicine*. 2007;13(3):332-9.
23. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *The Lancet*. 2003;361(9353):226-8.
24. Beauloye V, Zech F, Tran Thi Mong H, Clapuyt P, Maes M, Brichard SM. Determinants of early atherosclerosis in obese children and adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(8):3025-32.
25. Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. *Diabetes & metabolism*. 2008;34(1):12-8.
26. Balagopal P, De Ferranti SD, Cook S, Daniels SR, Gidding SS, Hayman LL, et al. Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(23):2749-69.
27. Karczewski J, Śledzińska E, Baturó A, Jończyk I, Maleszko A, Samborski P, et al. Obesity and inflammation. *European cytokine network*. 2018;29:83-94.
28. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(5):2409-15.
29. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, et al. Disruption of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2005;180(1):11-7.
30. Maury E, Brichard S. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;314(1):1-16.
31. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon III RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *circulation*. 2003;107(3):499-511.
32. Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, Carey IM, Ballam L, Morris JE, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2000;149(1):139-50.
33. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(3):254-66.
34. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clinical science*. 2016;130(12):943-86.
35. Ouni M, Schürmann A. Epigenetic contribution to obesity. *Mammalian genome*. 2020;31(5):134-45.
36. Kaushik P, Anderson JT. Obesity: epigenetic aspects. *Biomolecular concepts*. 2016;7(3):145-55.
37. Perfilyev A, Dahlman I, Gillberg L, Rosqvist F, Iggman D, Volkov P, et al. Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;105(4):991-1000.
38. Zhao Y, Zeng Y, Zeng D, Wang H, Zhou M, Sun N, et al. Probiotics and MicroRNA: their roles in the host–microbe interactions. *Frontiers in Microbiology*. 2021;11:604462.
39. Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & nutrition*. 2017;12:1-16.

40. Ibarra PE, García-Solís P, Solís-Sáinz JC, Cruz-Hernández A. Expression of miRNA in obesity and insulin resistance: a review. *Endokrynologia Polska*. 2021;72(1):73-80.
41. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:388354.
42. Sacco LD, Masotti A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of microRNAs binding to 5'untranslated region. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(1):480-95.
43. Dumortier O, Hinault C, Van Obberghen E. MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell metabolism*. 2013;18(3):312-24.
44. Ji C, Guo X. The clinical potential of circulating microRNAs in obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(12):731-43.
45. Landrier J-F, Derghal A, Mounien L. MicroRNAs in obesity and related metabolic disorders. *Cells*. 2019;8(8):859.
46. Heneghan H, Miller N, McAnena O, O'brien T, Kerin M. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(5):E846-E50.
47. Geng J, Ni Q, Sun W, Li L, Feng X. The links between gut microbiota and obesity and obesity related diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;147:112678.
48. Saklayen MG. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Current hypertension reports*. 2018;20(2):1-8.
49. Grundy SM. What is the contribution of obesity to the metabolic syndrome? *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2004;33(2):267-82.
50. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends in cardiovascular medicine*. 2016;26(4):364-73.
51. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in dermatology*. 2018;36(1):14-20.
52. Cerdó T, García-Santos JA, G. Bermúdez M, Campoy C. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. *Nutrients*. 2019;11(3):635.
53. Association AH. American Heart Association recommendations for physical activity in adults and kids. *The American Heart Association*. 2022.
54. Wadden TA, Webb VL, Moran CH, Bailer BA. Lifestyle modification for obesity: new developments in diet, physical activity, and behavior therapy. *Circulation*. 2012;125(9):1157-70.
55. Finer N. Low-calorie diets and sustained weight loss. *Obesity Research*. 2001;9(S11):290S-4S.
56. Kim JY. Optimal diet strategies for weight loss and weight loss maintenance. *Journal of obesity & metabolic syndrome*. 2020;30(1):20.
57. Fock KM, Khoo J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013;28:59-63.
58. Rössner S, Hammarstrand M, Hemmingsson E, Neovius M, Johansson K. Long-term weight loss and weight-loss maintenance strategies. *Obesity reviews*. 2008;9(6):624-30.
59. Ramage S, Farmer A, Apps Eccles K, McCargar L. Healthy strategies for successful weight loss and weight maintenance: a systematic review. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2014;39(1):1-20.
60. Kushner RF. Weight loss strategies for treatment of obesity. *Progress in cardiovascular diseases*. 2014;56(4):465-72.
61. Bello NT. Update on drug safety evaluation of naltrexone/bupropion for the treatment of obesity. *Expert opinion on drug safety*. 2019;18(7):549-52.
62. Lonneman Jr DJ, Rey JA, McKee BD. Phentermine/Topiramate extended-release capsules (qsymia) for weight loss. *Pharmacy and Therapeutics*. 2013;38(8):446.

63. Wilding JP, Batterham RL, Calanna S, Davies M, Van Gaal LF, Lingvay I, et al. Once-weekly semaglutide in adults with overweight or obesity. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(11):989-1002.
64. Singh G, Krauthamer M, Bjalme-Evans M. Wegovy (semaglutide): a new weight loss drug for chronic weight management. *Journal of Investigative Medicine*. 2022;70(1):5-13.
65. Age FA, Contraindications I. FDA-Approved Drugs to Treat Overweight and Obesity.
66. Jastreboff AM, Aronne LJ, Ahmad NN, Wharton S, Connery L, Alves B, et al. Tirzepatide once weekly for the treatment of obesity. *New England Journal of Medicine*. 2022;387(3):205-16.
67. Wiciński M, Gębalski J, Gołębiowski J, Malinowski B. Probiotics for the treatment of overweight and obesity in humans—a review of clinical trials. *Microorganisms*. 2020;8(8):1148.
68. Wong JM, De Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40(3):235-43.
69. Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: targets and therapy*. 2011:71-86.
70. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Molecular endocrinology*. 2014;28(8):1221-38.
71. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflammatory bowel diseases*. 2016;22(5):1137-50.
72. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2004;101(44):15718-23.
73. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*. 2006;444(7122):1027-31.
74. Blaut M. Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2015;74(3):227-34.
75. Armougom F, Raoult D. Use of pyrosequencing and DNA barcodes to monitor variations in Firmicutes and Bacteroidetes communities in the gut microbiota of obese humans. *BMC genomics*. 2008;9:1-12.
76. Zandbergen F, Van Dijk S, Müller M, Kersten S. Fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4: a potential target for dyslipidemia? *Clinical Lipidology and Metabolic Disorders*. 2006;1(2):227.
77. Mazloom K, Siddiqi I, Covasa M. Probiotics: how effective are they in the fight against obesity? *Nutrients*. 2019;11(2):258.
78. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(4):1102-9.
79. Dekaney CM, von Allmen DC, Garrison AP, Rigby RJ, Lund PK, Henning SJ, et al. Bacterial-dependent up-regulation of intestinal bile acid binding protein and transport is FXR-mediated following ileo-cecal resection. *Surgery*. 2008;144(2):174-81.
80. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell metabolism*. 2009;10(3):167-77.
81. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews*. 2007;87(4):1409-39.
82. Wichmann A, Allahyar A, Greiner TU, Plovier H, Lundén GÖ, Larsson T, et al. Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell host & microbe*. 2013;14(5):582-90.

83. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(43):16767-72.
84. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of gut microbiota in the aetiology of obesity: proposed mechanisms and review of the literature. *Journal of obesity*. 2016;2016(1):7353642.
85. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007;50:2374-83.
86. Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota–gut–brain axis in obesity. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2017;2(10):747-56.
87. Graham C, Mullen A, Whelan K. Obesity and the gastrointestinal microbiota: a review of associations and mechanisms. *Nutrition reviews*. 2015;73(6):376-85.
88. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
89. Obsen T, Faergeman NJ, Chung S, Martinez K, Govern S, Loreau O, et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases de novo lipid synthesis in human adipocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(6):580-90.
90. Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual review of nutrition*. 2002;22(1):505-31.
91. Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Ishihara K, Fushiki T. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids*. 2001;36:583-7.
92. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *nature*. 2006;444(7122):1022-3.
93. Cani PD, Van Hul M. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome. *Current opinion in biotechnology*. 2015;32:21-7.
94. Livingstone KM, Ramos-Lopez O, Perusse L, Kato H, Ordovas JM, Martínez JA. Precision nutrition: A review of current approaches and future endeavors. *Trends in Food Science & Technology*. 2022.
95. Morelli L, Capurso L. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology*. 2012;46:S1-S2.
96. Anukam KC, Reid G. Probiotics: 100 years (1907–2007) after Elie Metchnikoff's observation. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. 2007;1:466-74.
97. Mattarelli P, Biavati B. Species in the genus *Bifidobacterium*. *The Bifidobacteria and related organisms*: Elsevier; 2018. p. 9-48.
98. Rouxinol-Dias AL, Pinto AR, Janeiro C, Rodrigues D, Moreira M, Dias J, et al. Probiotics for the control of obesity—Its effect on weight change. *Porto Biomedical Journal*. 2016;1(1):12-24.
99. Arora T, Singh S, Sharma RK. Probiotics: interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition*. 2013;29(4):591-6.
100. Garcia-Gonzalez N, Battista N, Prete R, Corsetti A. Health-promoting role of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from fermented foods. *Microorganisms*. 2021;9(2):349.
101. Rios-Arce ND, Collins FL, Schepper JD, Steury MD, Raetz S, Mallin H, et al. Epithelial barrier function in gut-bone signaling. *Understanding the Gut-Bone Signaling Axis: Mechanisms and Therapeutic Implications*. 2017:151-83.
102. Hummel S, Veltman K, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Differential targeting of the E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin complex by gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(4):1140-7.

103. Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular microbiology*. 2007;9(3):804-16.
104. Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, Chadee K. The VSL# 3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2007;292(1):G315-G22.
105. Dai C, Zhao D-H, Jiang M. VSL# 3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier in vivo and in vitro via the p38 and ERK signaling pathways. *International journal of molecular medicine*. 2012;29(2):202-8.
106. Lee K, Paek K, Lee H, Park JH, Lee Y. Antiobesity effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *Journal of applied Microbiology*. 2007;103(4):1140-6.
107. O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International journal of food microbiology*. 2012;152(3):189-205.
108. Candela M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turrone S, Eikmanns BJ, et al. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *Journal of bacteriology*. 2007;189(16):5929-36.
109. Tobita K, Yanaka H, Otani H. *Lactobacillus crispatus* KT-11 enhances intestinal immune functions in C3H/HeN mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2010;56(6):441-5.
110. Wehkamp J, Harder Jr, Wehkamp K, Meissner BW-v, Schlee M, Enders C, et al. NF- $\kappa$ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infection and immunity*. 2004;72(10):5750-8.
111. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010;16(18):2202.
112. Yang J, Qian K, Wang C, Wu Y. Roles of probiotic lactobacilli inclusion in helping piglets establish healthy intestinal inter-environment for pathogen defense. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2018;10:243-50.
113. Rautava S, Arvilommi H, Isolauri E. Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatric research*. 2006;60(2):221-4.
114. Rodrigues A, Cara DC, Fretez S, Cunha FdQ, Vieira E, Nicoli J, et al. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology*. 2000;89(3):404-14.
115. He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A2 class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 2007;26(6):812-26.
116. Reséndiz-Albor AA, Reina-Garfias H, Rojas-Hernández S, Jarillo-Luna A, Rivera-Aguilar V, Miliar-García A, et al. Regionalization of pIgR expression in the mucosa of mouse small intestine. *Immunology Letters*. 2010;128(1):59-67.
117. Qiu X, Wu Q, Li W, Tang K, Zhang J. Effects of *Lactobacillus* supplementation on glycemic and lipid indices in overweight or obese adults: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*. 2022.
118. Bukowska H, Pieczul-Mróz J, Jastrzebska M, Chełstowski K, Naruszewicz M. Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis*. 1998;137(2):437-8.
119. Sohn M, Na GY, Chu J, Joung H, Kim B-K, Lim S. Efficacy and safety of *Lactobacillus plantarum* K50 on lipids in Koreans with obesity: A randomized, double-blind controlled clinical trial. *Frontiers in endocrinology*. 2022;12:790046.



120. Egea MB, Oliveira Filho JGd, Lemes AC. Investigating the Efficacy of *Saccharomyces boulardii* in Metabolic Syndrome Treatment: A Narrative Review of What Is Known So Far. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(15):12015.
121. Amin T, Mercer JG. Hunger and satiety mechanisms and their potential exploitation in the regulation of food intake. *Current obesity reports*. 2016;5:106-12.
122. Nabavi S, Rafrat M, Somi M-h, Homayouni-Rad A, Asghari-Jafarabadi M. Probiotic yogurt improves body mass index and fasting insulin levels without affecting serum leptin and adiponectin levels in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Journal of Functional Foods*. 2015;18:684-91.
123. Kim S-W, Park K-Y, Kim B, Kim E, Hyun C-K. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;431(2):258-63.
124. Cabral LQT, Ximenez JA, Moreno KGT, Fernandes R. Probiotics have minimal effects on appetite-related hormones in overweight or obese individuals: A systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition*. 2021;40(4):1776-87.
125. Naseri K, Saadati S, Ghaemi F, Ashtary-Larky D, Asbaghi O, Sadeghi A, et al. The effects of probiotic and synbiotic supplementation on inflammation, oxidative stress, and circulating adiponectin and leptin concentration in subjects with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: A GRADE-assessed systematic review, meta-analysis, and meta-regression of randomized clinical trials. *European journal of nutrition*. 2023;62(2):543-61.
126. Scerif M, Goldstone AP, Korbonits M. Ghrelin in obesity and endocrine diseases. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;340(1):15-25.
127. Torres-Fuentes C, Golubeva AV, Zhdanov AV, Wallace S, Arbolea S, Papkovsky DB, et al. Short-chain fatty acids and microbiota metabolites attenuate ghrelin receptor signaling. *The FASEB Journal*. 2019;33(12):13546-59.
128. Jones RB, Alderete TL, Martin AA, Geary BA, Hwang DH, Palmer SL, et al. Probiotic supplementation increases obesity with no detectable effects on liver fat or gut microbiota in obese Hispanic adolescents: a 16-week, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatric obesity*. 2018;13(11):705-14.
129. McFarlin BK, Henning AL, Bowman EM, Gary MA, Carbajal KM. Oral spore-based probiotic supplementation was associated with reduced incidence of post-prandial dietary endotoxin, triglycerides, and disease risk biomarkers. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2017;8(3):117.
130. Wu S-I, Lee M-C, Chen W-L, Huang C-C. *Lacticaseibacillus paracasei* PS23 increases ghrelin levels and modulates microbiota composition: a post-hoc analysis of a randomized controlled study. *Food & Function*. 2024.
131. Schalla MA, Stengel A. Effects of microbiome changes on endocrine ghrelin signaling—A systematic review. *Peptides*. 2020;133:170388.
132. Drissi F, Raoult D, Merhej V. Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microbial pathogenesis*. 2017;106:182-94.
133. Takemura N, Okubo T, Sonoyama K. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Experimental biology and medicine*. 2010;235(7):849-56.
134. Zhang Q, Wu Y, Fei X. Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2016;67(5):571-80.
135. Nasiri G, Bastani A, Haji-Aghamohammadi AA, Nooshabadi MR, Shahmirzalou P, Haghghian HK. Effects of probiotic and alpha-lipoic acid supplements, separately or in combination on the anthropometric indicators and maintenance of weight in overweight individuals. *Clinical nutrition ESPEN*. 2021;41:242-8.

136. Zarrati M, Salehi E, Nourijelyani K, Mofid V, Zadeh MJH, Najafi F, et al. Effects of probiotic yogurt on fat distribution and gene expression of proinflammatory factors in peripheral blood mononuclear cells in overweight and obese people with or without weight-loss diet. *Journal of the American College of Nutrition*. 2014;33(6):417-25.
137. Bastard J-P, Jardel C, Delattre J, Hainque B, Bruckert E, Oberlin F. Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation*. 1999.
138. Mazloom Z, Yousefinejad A, Dabbaghmanesh MH. Effect of probiotics on lipid profile, glycemic control, insulin action, oxidative stress, and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: a clinical trial. *Iranian journal of medical sciences*. 2013;38(1):38.
139. Everard A, Matamoros S, Geurts L, Delzenne NM, Cani PD. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. *MBio*. 2014;5(3):e01011-14.
140. Li X, Song Y, Ma X, Zhang Y, Liu X, Cheng L, et al. *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* alone or in combination regulate intestinal flora composition and systemic immunity to alleviate obesity syndrome in high-fat diet rat. *International Journal of Food Science & Technology*. 2018;53(1):137-46.
141. Núñez IN, Galdeano CM, de LeBlanc AdM, Perdígón G. *Lactobacillus casei* CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. *Nutrition*. 2015;31(7-8):1000-7.
142. Zarrati M, Salehi E, Mofid V, Zadeh-Attar MJH, Nourijelyani K, Bidad K, et al. Relationship between probiotic consumption and IL-10 and IL-17 secreted by PBMCs in overweight and obese people. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2013:404-6.
143. Galdeano CM, Perdigon G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical and vaccine immunology*. 2006;13(2):219-26.
144. Wang J, He M, Yang M, Ai X. Gut microbiota as a key regulator of intestinal mucosal immunity. *Life Sciences*. 2024:122612.
145. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013;5(6):1869-912.
146. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 2004;303(5664):1662-5.
147. Azad MAK, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *BioMed research international*. 2018;2018(1):8063647.
148. Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolin M, De Lara F, Espin E, et al. Increased mucosal tumour necrosis factor  $\alpha$  production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*. 2002;51(5):659-64.
149. Karamese M, Aydin H, Sengul E, Gelen V, Sevim C, Ustek D, et al. The immunostimulatory effect of lactic acid bacteria in a rat model. *Iranian journal of immunology*. 2016;13(3):220-8.
150. Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2010;107(1):454-9.
151. Giorgetti G, Brandimarte G, Fabiocchi F, Ricci S, Flamini P, Sandri G, et al. Interactions between innate immunity, microbiota, and probiotics. *Journal of immunology research*. 2015;2015(1):501361.
152. Maldonado Galdeano MC, Lemme Dumit JM, Thieblemont N, Carmuega E, Weill R, Perdigon GdV. Stimulation of innate immune cells induced by probiotics: Participation of toll-like receptors. 2015.

153. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *European journal of pharmacology*. 2020;877:173090.
154. Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. *Frontiers in immunology*. 2016;6:637.
155. Ukibe K, Miyoshi M, Kadooka Y. Administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*. 2015;114(8):1180-7.
156. Wang Y, Liu H, Zhao J. Macrophage polarization induced by probiotic bacteria: a concise review. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2020;12:798-808.
157. Underwood MA. Probiotics and innate and adaptive immune responses in premature infants. *Onco Therapeutics*. 2016;7(1-2).
158. Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC. Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells*. 2023;12(1):184.
159. McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(1):5-13.
160. Gauffin Cano P, Santacruz A, Moya Á, Sanz Y. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. 2012.
161. Poutahidis T, Kleiweiefeld M, Smillie C, Levkovich T, Perrotta A, Bhela S, et al. Microbial reprogramming inhibits Western diet-associated obesity. *PloS one*. 2013;8(7):e68596.
162. Gomes AC, Bueno AA, de Souza RGM, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition journal*. 2014;13:1-13.
163. Kwon H-K, Lee C-G, So J-S, Chae C-S, Hwang J-S, Sahoo A, et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(5):2159-64.
164. Dalmaso G, Cottrez F, Imbert V, Lagadec P, Peyron J-F, Rampal P, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1812-25.
165. Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF- $\beta$ -bearing regulatory cells. *The Journal of Immunology*. 2005;174(6):3237-46.
166. Jeong HR, Lee HS, Shim YS, Hwang JS. Positive associations between body mass index and hematological parameters, including RBCs, WBCs, and platelet counts, in Korean children and adolescents. *Children*. 2022;9(1):109.
167. Fujita B, Strodthoff D, Fritzenwanger M, Pfeil A, Ferrari M, Goebel B, et al. Altered red blood cell distribution width in overweight adolescents and its association with markers of inflammation. *Pediatric obesity*. 2013;8(5):385-91.
168. Široká M, Franco C, Guľašová Z, Hertelyová Z, Tomečková V, Rodella LF, et al. Nuclear factor-kB and nitric oxide synthases in red blood cells: good or bad in obesity? A preliminary study. *European Journal of Histochemistry: EJH*. 2020;64(1).
169. Davì G, Guagnano MT, Ciabattini G, Basili S, Falco A, Marinopiccoli M, et al. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *Jama*. 2002;288(16):2008-14.
170. Bo M, Raspo S, Morra F, Cassader M, Isaia G, Poli L. Body fat is the main predictor of fibrinogen levels in healthy non-obese men. *Metabolism*. 2004;53(8):984-8.
171. Hou J, Liu C, Yao P, Chen W, He M, Wang Y, et al. Association of adiposity indices with platelet distribution width and mean platelet volume in Chinese adults. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129677.
172. Zhou Y, Cao F, Luo F, Lin Q. Octacosanol and health benefits: Biological functions and mechanisms of action. *Food Bioscience*. 2022;47:101632.

173. Pointner A, Krammer UD, Tomeva E, Magnet U, Hippe B, Jacob U, et al. Lifestyle-Driven Variations in Nutrimiomic MicroRNA Expression Patterns across and beyond Genders. *Life*. 2024;14(3):390.
174. Díez-Sainz E, Lorente-Cebrián S, Aranaz P, Riezu-Boj JI, Martínez JA, Milagro FI. Potential mechanisms linking food-derived microRNAs, gut microbiota and intestinal barrier functions in the context of nutrition and human health. *Frontiers in nutrition*. 2021;8:586564.
175. Jia M, He J, Bai W, Lin Q, Deng J, Li W, et al. Cross-kingdom regulation by dietary plant miRNAs: an evidence-based review with recent updates. *Food & Function*. 2021;12(20):9549-62.
176. Wang Q, Sun Q, Wang J, Qiu X, Qi R, Huang J. *Lactobacillus plantarum* 299v changes miRNA expression in the intestines of piglets and leads to downregulation of LITAF by regulating ssc-miR-450a. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2021;13(4):1093-105.
177. Okuka N, Hippe B, Djordjević B, Ivanović N. Effects of probiotic intervention on obesity-related miRNAs. *Archives of Pharmacy*. 2024;74(Notebook 3):391-409.
178. Heydari Z, Rahaie M, Alizadeh AM, Agah S, Khalighfard S, Bahmani S. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* probiotics on the expression of microRNAs 135b, 26b, 18a and 155, and their involving genes in mice colon cancer. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019;11:1155-62.
179. Heydari Z, Rahaie M, Alizadeh AM. Different anti-inflammatory effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in hepatocellular carcinoma cancer mouse through impact on microRNAs and their target genes. *Journal of nutrition & intermediary metabolism*. 2019;16:100096.
180. Vahidi Z, Saghi E, Mahmoudi M, RezaieYazdi Z, Esmaeili S-A, Zemorshidi F, et al. *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus delbrueckii* Ameliorate the Expression of miR-125a and miR-146a in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2024:1-12.
181. Vahidi Z, Samadi M, Mahmoudi M, RezaieYazdi Z, Sahebari M, Tabasi N, et al. *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus delbrueckii* ameliorate the expression of miR-155 and miR-181a in SLE patients. *Journal of functional foods*. 2018;48:228-33.
182. Thakur N, Rokana N, Panwar H. Probiotics, Selection criteria, safety and role in health and. *Journal of Innovative Biology* January. 2016;3(1):259-70.
183. de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Júnior AIM, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*. 2018;36(8):2060-76.
184. Haslberger AG. *Advances in Precision Nutrition, Personalization and Health Aging*: Springer; 2022.
185. Hazards EPoB, Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, et al. Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microorganisms intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal*. 2023;21(1):e07747.
186. Nordström EA, Teixeira C, Montelius C, Jeppsson B, Larsson N. *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (LP299V®): Three decades of research. *Beneficial microbes*. 2021;12(5):441-65.
187. Rondanelli M, Miraglia N, Putignano P, Castagliuolo I, Brun P, Dall'Acqua S, et al. Effects of 60-day *Saccharomyces boulardii* and superoxide dismutase supplementation on body composition, hunger sensation, pro/antioxidant ratio, inflammation and hormonal lipo-metabolic biomarkers in obese adults: a double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*. 2021;13(8):2512.
188. Singh DK, Li L, Porter TD. Policosanol inhibits cholesterol synthesis in hepatoma cells by activation of AMP-kinase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;318(3):1020-6.

189. Zrnić Ćirić M. Ефекат суплементације комбинацијом октакозанола и витамина К2 на PCSK9, липидни профил, оксидативни стрес и инфламацију код пацијената на терапији аторвастатином. Универзитет у Београду. 2023.
190. Kabir Y, Kimura S. Biodistribution and metabolism of orally administered octacosanol in rats. *Annals of nutrition and metabolism*. 1993;37(1):33-8.
191. Taylor JC, Rapport L, Lockwood GB. Octacosanol in human health. *Nutrition*. 2003;19(2):192-5.
192. Banerjee S, Ghoshal S, Porter TD. Activation of AMP-kinase by policosanol requires peroxisomal metabolism. *Lipids*. 2011;46:311-21.
193. Keller S, Gimmler F, Jahreis G. Octacosanol administration to humans decreases neutral sterol and bile acid concentration in feces. *Lipids*. 2008;43:109-15.
194. Sharma R, Matsuzaka T, Kaushik MK, Sugawara T, Ohno H, Wang Y, et al. Octacosanol and policosanol prevent high-fat diet-induced obesity and metabolic disorders by activating brown adipose tissue and improving liver metabolism. *Scientific reports*. 2019;9(1):5169.
195. Lee S-H, Scott SD, Pekas EJ, Lee J-G, Park S-Y. Improvement of lipids and reduction of oxidative stress with octacosanol after taekwondo training. *International Journal of Sports Physiology and Performance*. 2019;14(9):1297-303.
196. Arora MK, Pandey S, Tomar R, Sahoo J, Kumar D, Jangra A. Therapeutic potential of policosanol in the concurrent management of dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;8(1):11.
197. Miao ST, Lu QS, Zhou YJ, Chang YN, Xu T, Zhu MY. Oral administration of octacosanol modulates the gut bacteria and protects the intestinal barrier in ulcerative colitis mice. *Journal of Food Biochemistry*. 2022;46(10):e14284.
198. Zhai Z, Liu J, Niu K-M, Lin C, Tu Y, Liu Y, et al. Integrated Metagenomics and Metabolomics to reveal the effects of policosanol on modulating the gut microbiota and lipid metabolism in hyperlipidemic C57BL/6 mice. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12:722055.
199. Weerawatanakorn M, Meerod K, Wongwaiwech D, Ho C-T. Policosanols: Chemistry, occurrence, and health effects. *Current Pharmacology Reports*. 2019;5:131-49.
200. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier MF, Courtade-Saïdi M, Vincent S, et al. Guidelines for May-Grünwald–Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP). *Cytopathology*. 2016;27(5):359-68.
201. Nikodijević S, Blagojević V, Ćuruvija I, Kosanović D, Djukić T, Djordjević B, et al. Selectivity of polyclonal repertoire of anti-microbial IgA and its subclasses in saliva and serum in humans. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2022;96(6):e13223.
202. Chang B, Park S, Jang Y, Ko S, Joo N, Kim S, et al. Effect of functional yogurt NY-YP901 in improving the trait of metabolic syndrome. *European journal of clinical nutrition*. 2011;65(11):1250-5.
203. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microbial pathogenesis*. 2012;53(2):100-8.
204. Łągowska K, Drzymała-Czyż S. A low glycemic index, energy-restricted diet but not *Lactobacillus rhamnosus* supplementation changes fecal short-chain fatty acid and serum lipid concentrations in women with overweight or obesity and polycystic ovary syndrome. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2022;26(3).
205. Zikou E, Dovrolis N, Dimosthenopoulos C, Gazouli M, Makrilakis K. The Effect of Probiotic Supplements on Metabolic Parameters of People with Type 2 Diabetes in Greece—A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*. 2023;15(21):4663.

206. Patrocínio M, Paragas N, Perez J, Que D, Quiogue K, Reyes M, et al. The effects of sugar cane policosanol on the LDL, HDL, Triglyceride and Total Cholesterol Levels of Dyslipidemic Patients: A Meta-Analysis. *Anesthesia and Medical Practice Journal*. 2017;100017.
207. Cho K-H, Kim S-J, Yadav D, Kim J-Y, Kim J-R. Consumption of cuban policosanol improves blood pressure and lipid profile via enhancement of HDL functionality in healthy women subjects: Randomized, double-blinded, and placebo-controlled study. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018.
208. Chen JT, Wesley R, Shamburek RD, Pucino F, Csako G. Meta-analysis of natural therapies for hyperlipidemia: plant sterols and stanols versus policosanol. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2005;25(2):171-83.
209. Rye K-A, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *Journal of lipid research*. 2009;50:S195-S200.
210. Tian L, Zhao R, Xu X, Zhou Z, Xu X, Luo D, et al. Modulatory effects of *Lactiplantibacillus plantarum* on chronic metabolic diseases. *Food Science and Human Wellness*. 2023;12(4):959-74.
211. Güemes M, Rahman SA, Hussain K. What is a normal blood glucose? *Archives of disease in childhood*. 2016;101(6):569-74.
212. Koutnikova H, Genser B, Monteiro-Sepulveda M, Faurie J-M, Rizkalla S, Schrezenmeir J, et al. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ open*. 2019;9(3).
213. Sun J, Buys NJ. Glucose-and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *British journal of nutrition*. 2016;115(7):1167-77.
214. Liu T, Li Y, Zhao M, Mo Q, Feng F. Weight-reducing effect of *Lactobacillus plantarum* ZJUFT17 isolated from sourdough ecosystem. *Nutrients*. 2020;12(4):977.
215. Gøbel RJ, Larsen N, Jakobsen M, Mølgaard C, Michaelsen KF. Probiotics to adolescents with obesity: effects on inflammation and metabolic syndrome. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2012;55(6):673-8.
216. Kopp L, Schweinlin A, Tingö L, Hutchinson AN, Feit V, Jähnichen T, et al. Potential Modulation of Inflammation and Physical Function by Combined Probiotics, Omega-3 Supplementation and Vitamin D Supplementation in Overweight/Obese Patients with Chronic Low-Grade Inflammation: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(10):8567.
217. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017;13(11):633-43.
218. Khaodhiar L, Ling PR, Blackburn GL, Bistrrian BR. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2004;28(6):410-5.
219. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- $\alpha$  and IL-6. *Diabetes research and clinical practice*. 2005;69(1):29-35.
220. Nehring SM, Goyal A, Patel BC. C reactive protein. 2017.
221. Popko K, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, Plywaczewski R, Stoklosa A, Gorecka D, et al. Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF- $\alpha$  and the development of inflammation in obese subjects. *European journal of medical research*. 2010;15:1-3.
222. Sumarac-Dumanovic M, Stevanovic D, Ljubic A, Jorga J, Simic M, Stamenkovic-Pejkovic D, et al. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. *International journal of obesity*. 2009;33(1):151-6.
223. Noormohammadi M, Ghorbani Z, Löber U, Mahdavi-Roshan M, Bartolomeus TU, Kazemi A, et al. The effect of probiotic and synbiotic supplementation on appetite-regulating hormones and desire

- to eat: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacological Research*. 2022;106614.
224. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(1):240-4.
225. Zhou Y, Rui L. Leptin signaling and leptin resistance. *Frontiers of medicine*. 2013;7:207-22.
226. Cheng Y-C, Liu J-R. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on energy metabolism, leptin resistance, and gut microbiota in mice with diet-induced obesity. *Nutrients*. 2020;12(9):2557.
227. Malik M, Suboc TM, Tyagi S, Salzman N, Wang J, Ying R, et al. *Lactobacillus plantarum* 299v supplementation improves vascular endothelial function and reduces inflammatory biomarkers in men with stable coronary artery disease. *Circulation research*. 2018;123(9):1091-102.
228. Mu J, Zhang J, Zhou X, Zalan Z, Hegyi F, Takács K, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* KFY02 isolated from naturally fermented yogurt on the weight loss in mice with high-fat diet-induced obesity via PPAR- $\alpha/\gamma$  signaling pathway. *Journal of Functional Foods*. 2020;75:104264.
229. Qiao Y, Sun J, Xia S, Li L, Li Y, Wang P, et al. Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. *Journal of Functional Foods*. 2015;14:424-34.
230. Cao S, Ryan PM, Salehisahlabadi A, Abdulazeem HM, Karam G, Černevičiūtė R, et al. Effect of probiotic and synbiotic formulations on anthropometrics and adiponectin in overweight and obese participants: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of King Saud University-Science*. 2020;32(2):1738-48.
231. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. *Molecular metabolism*. 2015;4(6):437-60.
232. Wang Y, Gao L, Yang Z, Chen F, Zhang Y. Effects of probiotics on ghrelin and lungs in children with acute lung injury: A double-blind randomized, controlled trial. *Pediatric Pulmonology*. 2018;53(2):197-203.
233. Haqq AM, Farooqi IS, O’Rahilly S, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, et al. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(1):174-8.
234. Zhou L, Lin S, Zhang F, Ma Y, Fu Z, Gong Y, et al. The correlation between RDW, MPV and weight indices after metabolic surgery in patients with obesity and DM/IGR: Follow-up observation at 12 months. *Diabetes Therapy*. 2020;11:2269-81.
235. Samocha-Bonet D, Ben-Ami R, Shapira I, Shenkerman G, Abu-Abeid S, Stern N, et al. Flow-resistant red blood cell aggregation in morbid obesity. *International journal of obesity*. 2004;28(12):1528-34.
236. Korniluk A, Koper-Lenkiewicz OM, Kamińska J, Kemonia H, Dymicka-Piekarska V. Mean platelet volume (MPV): new perspectives for an old marker in the course and prognosis of inflammatory conditions. *Mediators of inflammation*. 2019;2019(1):9213074.
237. Coban E, Ozdogan M, Yazicioglu G, Akçit F. The mean platelet volume in patients with obesity. *International journal of clinical practice*. 2005;59(8):981-2.
238. Ding Q, Wang F, Guo X, Liang M. The relationship between mean platelet volume and metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus: A retrospective study. *Medicine*. 2021;100(13):e25303.
239. Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *Journal of internal medicine*. 2018;284(5):492-504.

240. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*. 2010;2010(1):289645.
241. Hamad MA, Krauel K, Schanze N, Gauchel N, Stachon P, Nuehrenberg T, et al. Platelet subtypes in inflammatory settings. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;9:823549.
242. de Gonzalo-Calvo D, de Luxán-Delgado B, Rodríguez-González S, García-Macia M, Suárez FM, Solano JJ, et al. Platelet distribution width is associated with 1-year all-cause mortality in the elderly population. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics*. 2013;4(1):12-6.
243. Vayá A, Carmona P, Badia N, Hernandez-Mijares A, Bautista D. Association between high red blood cell distribution width and metabolic syndrome. Influence of abdominal obesity. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2011;47(1):75-7.
244. Emamian M, Hasanian SM, Tayefi M, Bijari M, Movahedian far F, Shafiee M, et al. Association of hematocrit with blood pressure and hypertension. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2017;31(6):e22124.
245. Osadnik T, Strzelczyk J, Hawranek M, Lekston A, Wasilewski J, Kurek A, et al. Red cell distribution width is associated with long-term prognosis in patients with stable coronary artery disease. *BMC cardiovascular disorders*. 2013;13:1-8.
246. Hotoleanu C. Association between obesity and venous thromboembolism. *Medicine and pharmacy reports*. 2020;93(2):162.
247. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. 2001;103(4):491-5.
248. Ditschuneit HH, Flechtner-Mors M, Adler G. Fibrinogen in obesity before and after weight reduction. *Obesity Research*. 1995;3(1):43-8.
249. Bourassa KA, Postolache TT, Dagdag A, Fuchs D, Okusaga OO. Plasma soluble P-selectin correlates with triglycerides and nitrite in overweight/obese patients with schizophrenia. *Pteridines*. 2020;31(1):61-7.
250. Gallistl S, Sudi K, Borkenstein M, Weinhandl G, Zotter H, Muntean W. Correlation between cholesterol, soluble P-selectin, and D-dimer in obese children and adolescents. *Blood coagulation & fibrinolysis*. 2000;11(8):755-60.
251. Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davi G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obesity reviews*. 2012;13(1):27-42.
252. Bagni UV, Luiz RR, da Veiga GV. Overweight is associated with low hemoglobin levels in adolescent girls. *Obesity research & clinical practice*. 2013;7(3):e218-e29.
253. Kamruzzaman M. Is BMI associated with anemia and hemoglobin level of women and children in Bangladesh: A study with multiple statistical approaches. *PloS one*. 2021;16(10):e0259116.
254. Elmugabil A, Rayis DA, Abdelmageed RE, Adam I, Gasim GI. High level of hemoglobin, white blood cells and obesity among Sudanese women in early pregnancy: a cross-sectional study. *Future science OA*. 2017;3(2):FSO182.
255. He S, Gu H, Yang J, Su Q, Li X, Qin L. Hemoglobin concentration is associated with the incidence of metabolic syndrome. *BMC endocrine disorders*. 2021;21:1-11.
256. Bering S, Sjøltov L, Wrisberg SS, Berggren A, Alenfall J, Jensen M, et al. Viable, lyophilized lactobacilli do not increase iron absorption from a lactic acid-fermented meal in healthy young women, and no iron absorption occurs in the distal intestine. *British journal of nutrition*. 2007;98(5):991-7.
257. Hoppe M, Önning G, Hulthén L. Freeze-dried *Lactobacillus plantarum* 299v increases iron absorption in young females—Double isotope sequential single-blind studies in menstruating women. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189141.
258. Korčok DJ, Tršić-Milanović NA, Ivanović ND, Đorđević BI. Development of probiotic formulation for the treatment of iron deficiency anemia. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2018;66(4):347-52.



259. Axling U, Önning G, Combs MA, Bogale A, Höglström M, Svensson M. The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on iron status and physical performance in female iron-deficient athletes: a randomized controlled trial. *Nutrients*. 2020;12(5):1279.
260. McNaught CE, Woodcock NP, Anderson AD, MacFie J. A prospective randomised trial of probiotics in critically ill patients. *Clinical Nutrition*. 2005;24(2):211-9.
261. Gawlik-Dziki U, Baraniak B, Sikora M, Jakubczyk A, Kapusta I, Świeca M. Potentially bioaccessible phenolic and antioxidant potential of fresh and stored lentil sprouts—Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v enrichment. *Molecules*. 2021;26(8):2109.
262. OjiNjideka Hemphill N, Pezley L, Steffen A, Elam G, Kominiarek MA, Odoms-Young A, et al. Feasibility Study of *Lactobacillus Plantarum* 299v Probiotic Supplementation in an Urban Academic Facility among Diverse Pregnant Individuals. *Nutrients*. 2023;15(4):875.
263. Kaźmierczak-Siedlecka K, Daca A, Folwarski M, Witkowski JM, Bryl E, Makarewicz W. The role of *Lactobacillus plantarum* 299v in supporting treatment of selected diseases. *Central European Journal of Immunology*. 2020;45(4):488-93.
264. Datta S, Timson DJ, Annapure US. Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017;97(9):3039-49.
265. Bai J, Yang T, Zhou Y, Xu W, Han S, Guo T, et al. Octacosanol modifies obesity, expression profile and inflammation response of hepatic tissues in high-fat diet mice. *Foods*. 2022;11(11):1606.
266. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *International journal of obesity*. 2006;30(3):400-18.
267. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clinical biochemistry*. 2002;35(8):627-31.
268. Olusi S. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *International journal of obesity*. 2002;26(9):1159-64.
269. Wang T, Liu Y-y, Wang X, Yang N, Zhu H-b, Zuo P-p. Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta pharmacologica sinica*. 2010;31(7):765-74.
270. Xin J, Zeng D, Wang H, Sun N, Zhao Y, Dan Y, et al. Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 promotes growth performance, intestinal immunity, and gut microbiota in piglets. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2020;12:184-93.
271. Shi C-w, Cheng M-y, Yang X, Lu Y-y, Yin H-d, Zeng Y, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes mouse gut microbiota diversity and T cell differentiation. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:607735.
272. Rodríguez CP, González MC, Aguilar-Salinas CA, Najera-Medina O. Peripheral lymphocytes, obesity, and metabolic syndrome in young adults: an immunometabolism study. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2018;16(7):342-9.
273. Hernández A, Pozo-Rubio T, Gheorghe A, Díaz L, de Heredia FP, De Miguel P, et al. Immunological biomarkers in childhood and adolescence obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2013;72(OCE1):E91.
274. Mauro C, Smith J, Cucchi D, Coe D, Fu H, Bonacina F, et al. Obesity-induced metabolic stress leads to biased effector memory CD4+ T cell differentiation via PI3K p110 $\delta$ -Akt-mediated signals. *Cell metabolism*. 2017;25(3):593-609.
275. Rodríguez-López CP, González-Torres MC, Aguilar-Salinas CA, Nájera-Medina O. Dash diet as a proposal for improvement in cellular immunity and its association with metabolic parameters in persons with overweight and obesity. *Nutrients*. 2021;13(10):3540.

276. Rask C, Adlerberth I, Berggren A, Ahrén I, Wold A. Differential effect on cell-mediated immunity in human volunteers after intake of different lactobacilli. *Clinical & Experimental Immunology*. 2013;172(2):321-32.
277. Tang L, Wang H, Cao K, Xu C, Ma A, Zheng M, et al. Dysfunction of circulating CD3+ CD56+ NKT-like cells in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Medical Sciences*. 2023;20(5):652.
278. Naujoks W, Quandt D, Hauffe A, Kielstein H, Bähr I, Spielmann J. Characterization of surface receptor expression and cytotoxicity of human NK cells and NK cell subsets in overweight and obese humans. *Frontiers in immunology*. 2020;11:573200.
279. Gill H, Rutherford K, Cross M. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *Journal of clinical immunology*. 2001;21:264-71.
280. Chiang B-L, Sheih Y, Wang L, Liao C, Gill H. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *European journal of clinical nutrition*. 2000;54(11):849-55.
281. Seifert S, Bub A, Franz CM, Watzl B. Probiotic *Lactobacillus Casei* Shirota Supplementation Does Not Modulate Immunity in Healthy Men with Reduced Natural Killer Cell Activity<sup>1–3</sup>. *The Journal of nutrition*. 2011;141(5):978-84.
282. Corica F, Allegra A, Buemi M, Corsonello A, Bonanzinga S, Rubino F, et al. Reduced plasma concentrations of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in obese women. *International journal of obesity*. 1997;21(8):704-7.
283. Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. Elevated expression of transforming growth factor- $\beta$  in adipose tissue from obese mice. *Molecular medicine*. 1997;3:37-48.
284. Fain JN, Tichansky DS, Madan AK. Transforming growth factor  $\beta$ 1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. *Metabolism*. 2005;54(11):1546-51.
285. Bastelica D, Mavri A, Verdier M, Berthet B, Juhan-Vague I, Alessi M-C. Relationships between fibrinolytic and inflammatory parameters in human adipose tissue: strong contribution of TNF $\alpha$  receptors to PAI-1 levels. *Thrombosis and haemostasis*. 2002;88(09):481-7.
286. Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer A, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*. 2000;47(1):79-87.
287. Kusumo PD, Bela B, Wibowo H, Munasir Z, Surono I. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 supplementation increases faecal sIgA and immune response in children younger than two years. *Beneficial microbes*. 2019;10(3):245-52.
288. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*. 2014;5:520.
289. Li A, Wang Y, Li Z, Qamar H, Mehmood K, Zhang L, et al. Probiotics isolated from yaks improves the growth performance, antioxidant activity, and cytokines related to immunity and inflammation in mice. *Microbial Cell Factories*. 2019;18:1-12.
290. Sindhu KN, Sowmyanarayanan TV, Paul A, Babji S, Ajjampur SS, Priyadarshini S, et al. Immune response and intestinal permeability in children with acute gastroenteritis treated with *Lactobacillus rhamnosus* GG: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical infectious diseases*. 2014;58(8):1107-15.
291. Michaličková D. Uticaj suplementacije sojem *Lactobacillus helveticus* L10 na markere imunskog i oksidativnog statusa vrhunskih sportista. Универзитет у Београду. 2017.
292. Karkeni E, Astier J, Tourniaire F, El Abed M, Romier B, Gouranton E, et al. Obesity-associated inflammation induces microRNA-155 expression in adipocytes and adipose tissue: outcome on adipocyte function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(4):1615-26.

293. Mahdavi R, Ghorbani S, Alipoor B, Panahi G, Khodabandehloo H, Esfahani EN, et al. Decreased serum level of miR-155 is associated with obesity and its related metabolic traits. *Clinical Laboratory*. 2018;64.
294. Lopez YON, Garufi G, Seyhan AA. Altered levels of circulating cytokines and microRNAs in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Molecular biosystems*. 2017;13(1):106-21.
295. Tryggstad JB, Teague AM, Sparling DP, Jiang S, Chernausk SD. Macrophage-derived microRNA-155 increases in obesity and influences adipocyte metabolism by targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obesity*. 2019;27(11):1856-64.
296. Algieri F, Garrido-Mesa J, Vezza T, Rodríguez-Sojo MJ, Rodríguez-Cabezas ME, Olivares M, et al. Intestinal anti-inflammatory effects of probiotics in DNBS-colitis via modulation of gut microbiota and microRNAs. *European Journal of Nutrition*. 2021;60:2537-51.
297. Chen Z, Ou H, Wu H, Wu P, Mo Z. Role of microRNA in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *DNA and cell biology*. 2019;38(8):754-62.
298. Sørensen AE, Wissing ML, Salö S, Englund ALM, Dalgaard LT. MicroRNAs related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Genes*. 2014;5(3):684-708.
299. Calcaterra V, Rossi V, Massini G, Casini F, Zuccotti G, Fabiano V. Probiotics and polycystic ovary syndrome: a perspective for management in adolescents with obesity. *Nutrients*. 2023;15(14):3144.
300. Fu T, Seok S, Choi S, Huang Z, Suino-Powell K, Xu HE, et al. MicroRNA 34a inhibits beige and brown fat formation in obesity in part by suppressing adipocyte fibroblast growth factor 21 signaling and SIRT1 function. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(22):4130-42.
301. Mone P, de Donato A, Varzideh F, Kansakar U, Jankauskas SS, Pansini A, et al. Functional role of miR-34a in diabetes and frailty. *Frontiers in Aging*. 2022;3:949924.
302. Ahmadpour F, Nourbakhsh M, Razzaghy-Azar M, Khaghani S, Alipoor B, Abdolvahabi Z, et al. The association of plasma levels of miR-34a AND miR-149 with obesity and insulin resistance in obese children and adolescents. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*. 2018;14(2):149.
303. Ng R, Wu H, Xiao H, Chen X, Willenbring H, Steer CJ, et al. Inhibition of microRNA-24 expression in liver prevents hepatic lipid accumulation and hyperlipidemia. *Hepatology*. 2014;60(2):554-64.
304. Nunez Lopez YO, Garufi G, Pasarica M, Seyhan AA. Elevated and correlated expressions of miR-24, miR-30d, miR-146a, and SFRP-4 in human abdominal adipose tissue play a role in adiposity and insulin resistance. *International Journal of Endocrinology*. 2018;2018.
305. Zhang B, Xing L, Wang B. Dysregulation of circulating miR-24-3p in children with obesity and its predictive value for metabolic syndrome. *Obesity Facts*. 2021;14(5):456-62.
306. Ren K, Zhu X, Zheng Z, Mo Z-C, Peng X-S, Zeng Y-Z, et al. MicroRNA-24 aggravates atherosclerosis by inhibiting selective lipid uptake from HDL cholesterol via the post-transcriptional repression of scavenger receptor class B type I. *Atherosclerosis*. 2018;270:57-67.
307. Ortiz-Dosal A, Rodil-Garcia P, Salazar-Olivo LA. Circulating microRNAs in human obesity: a systematic review. *Biomarkers*. 2019;24(6):499-509.
308. Rockstroh D, Löffler D, Kiess W, Landgraf K, Körner A. Regulation of human adipogenesis by miR125b-5p. *Adipocyte*. 2016;5(3):283-97.
309. Brandao BB, Guerra BA, Mori MA. Shortcuts to a functional adipose tissue: The role of small non-coding RNAs. *Redox biology*. 2017;12:82-102.
310. Ortega FJ, Mercader JM, Catalan V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clinical chemistry*. 2013;59(5):781-92.

311. Rippe C, Blimline M, Magerko KA, Lawson BR, LaRocca TJ, Donato AJ, et al. MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. *Experimental gerontology*. 2012;47(1):45-51.
312. Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Bidzhekov K, Gremse F, Grommes J, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nature medicine*. 2014;20(4):368-76.
313. Feng X, Wang H, Ye S, Guan J, Tan W, Cheng S, et al. Up-regulation of microRNA-126 may contribute to pathogenesis of ulcerative colitis via regulating NF-kappaB inhibitor Ikb $\alpha$ . *PloS one*. 2012;7(12):e52782.
314. Benderska N, Dittrich A-L, Knaup S, Rau TT, Neufert C, Wach S, et al. miRNA-26b overexpression in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(9):2039-51.
315. Cristóbal I, Manso R, González-Alonso P, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Clinical Value of miR-26b Discriminating Ulcerative Colitis-associated Colorectal Cancer in the Subgroup of Patients with Metastatic Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2015;21(10):E24-E5.
316. Liu H, Chu W, Gong L, Gao X, Wang W. MicroRNA-26b is upregulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease and promotes the expression of amyloid- $\beta$  by targeting insulin-like growth factor 1. *Molecular Medicine Reports*. 2016;13(3):2809-14.
317. Xu G, Ji C, Song G, Zhao C, Shi C, Song L, et al. MiR-26b modulates insulin sensitivity in adipocytes by interrupting the PTEN/PI3K/AKT pathway. *International journal of obesity*. 2015;39(10):1523-30.
318. Fu X, Dong B, Tian Y, Lefebvre P, Meng Z, Wang X, et al. MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(6):2497-509.
319. Acharya A, Berry DC, Zhang H, Jiang Y, Jones BT, Hammer RE, et al. miR-26 suppresses adipocyte progenitor differentiation and fat production by targeting Fbx19. *Genes & Development*. 2019;33(19-20):1367-80.
320. Xu G, Ji C, Shi C, Fu H, Zhu L, Zhu L, et al. Modulation of hsa-miR-26b levels following adipokine stimulation. *Molecular biology reports*. 2013;40:3577-82.
321. Zillikens MC, van Meurs JB, Rivadeneira F, Amin N, Hofman A, Oostra BA, et al. SIRT1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity. *Diabetes*. 2009;58(12):2828-34.
322. Liu T, Song X, An Y, Wu X, Zhang W, Li J, et al. Lactobacillus rhamnosus GG colonization in early life ameliorates inflammaging of offspring by activating SIRT1/AMPK/PGC-1 $\alpha$  pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021;2021.
323. Khalili L, Alipour B, Asghari Jafarabadi M, Hassanalilou T, Mesgari Abbasi M, Faraji I. Probiotic assisted weight management as a main factor for glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2019;11:1-9.
324. Wellman AS, Metukuri MR, Kazgan N, Xu X, Xu Q, Ren NS, et al. Intestinal epithelial sirtuin 1 regulates intestinal inflammation during aging in mice by altering the intestinal microbiota. *Gastroenterology*. 2017;153(3):772-86.
325. Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF- $\alpha$  and obesity. *TNF Pathophysiology*. 2010;11:145-56.
326. Wang T, Yan H, Lu Y, Li X, Wang X, Shan Y, et al. Anti-obesity effect of Lactobacillus rhamnosus LS-8 and Lactobacillus crustorum MN047 on high-fat and high-fructose diet mice base on inflammatory response alleviation and gut microbiota regulation. *European journal of nutrition*. 2020;59:2709-28.
327. Lazarenko L, Melnykova O, Babenko L, Bubnov R, Beregova T, Falalyeyeva T, et al. Probiotic Concepts of Predictive, Preventive, and Personalized Medical Approach for Obesity: Lactic Acid

- Bacteria and Bifidobacteria Probiotic Strains Improve Glycemic and Inflammation Profiles. *Microbiome in 3P Medicine Strategies: The First Exploitation Guide*: Springer; 2023. p. 371-90.
328. Lee I-K. The role of pyruvate dehydrogenase kinase in diabetes and obesity. *Diabetes & metabolism journal*. 2014;38(3):181.
329. Jeoung NH, Harris RA. Pyruvate dehydrogenase kinase-4 deficiency lowers blood glucose and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008;295(1):E46-E54.
330. Rosa G, Di Rocco P, Manco M, Greco AV, Castagneto M, Vidal H, et al. Reduced PDK4 expression associates with increased insulin sensitivity in postobese patients. *Obesity research*. 2003;11(2):176-82.

## 8 Прилози

### 8.1 Објављени и саопштени резултати који чине саставни дио докторске дисертације

#### Радови објављени у истакнутим међународним часописима (M21):

1. Okuka N, Schuh V, Krammer U, Polovina S, Sumarac-Dumanovic M, Milinkovic N, Velickovic K, Djordjevic B, Haslberger A, Ivanovic N. D. Epigenetic Aspects of a New Probiotic Concept - A Pilot Study. *Life*, 2023; 13(9).
2. Okuka N, Milinkovic N, Velickovic K, Polovina S, Sumarac-Dumanovic M, Minic R, Korčok D, Djordjevic B, Ivanovic N D. Beneficial effects of a new probiotic formulation on adipocytokines, appetite-regulating hormones, and metabolic parameters in obese women. *Food & Function*, 2024; 15(14), 7658-7668.

#### Саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (M34):

1. **Okuka N**, Ivanovic N, Milinkovic N, Velickovic K, Polovina S, Sumarac-Dumanovic M, Haslberger A, Hippe B, Djordjevic B. Effects of probiotic supplementation on inflammatory status of obese women. Book of Abstracts - 11th International Conference on Probiotics, Prebiotics & New Foods, Nutraceuticals and Botanicals for Nutrition & Human and Microbiota Health, 12-14<sup>th</sup> September 2021. Rome, Italy.
2. **Okuka N**, Veličković K, Ivanović N, Milinković N, Polovina S, Šumarac-Dumanović M, Hippe B, Haslberger A, Đorđević B. Effect of probiotic supplementation combined with dietary restriction on red blood cells indices in obese/overweight women. Book of abstracts - 14<sup>th</sup> International Congress on Nutrition: „A place where science meets practice“. 8-10<sup>th</sup> October 2021, Belgrade.
3. **Okuka N**, Veličković K, Ivanović N, Milinković N, Polovina S, Šumarac-Dumanović M, Hippe B, Haslberger A, Đorđević B. Effects of probiotic supplementation combined with dietary advice on ghrelin levels and inflammatory status in overweight and obese women. Book of abstracts - 14<sup>th</sup> International Congress on Nutrition: „A place where science meets practice“. 8-10<sup>th</sup> October 2021, Belgrade.
4. **Okuka N**, Ivanović N, Milinković N, Veličković K, Đorđević B. Novel probiotic approach affects circulating leptin, adiponectin, ghreline and interleukin-6 concentrations in obese women. 5th Congress of pharmacists of Bosnia and Herzegovina with international participation, 9 – 12<sup>th</sup> November 2023, Sarajevo; Abstract book, 78-79.

#### Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

5. Veličković K, **Okuka N**, Polovina S, Šumarac-Dumanović M, Ivanović N, Milinković N, Đorđević B. Efekti suplementacije probiotikom na morfologiju krvnih pločica gojaznih žena i žena sa prekomernom težinom. 8th Congress of Pharmacists of Serbia with international participation, 12-15<sup>th</sup> October 2022, Belgrade; 72: S509-S510.

## 9 Биографија

Нина Окука, рођ. Вукичевић, је рођена 23.07.1992. у Илијашу, Босна и Херцеговина. Основну и средњу школу завршила је у Брчком, а студије фармације на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци које је уписала 2011. године. Добитник је „Златне значке“ Универзитета у Бањој Луци као најбољи студент генерације. Била је стипендиста престижне стипендије „Фонд др Милан Јелић“ која се додељује изванредним студентима. Интегрисане студије фармације завршила је 2016. године са просечном оценом 9,89.

Након завршених студија ангажована је као асистент приправник на Медицинском факултету у Бањој Луци. Од 2019. године запослена је у звању асистента, а данас у звању вишег асистента на Катедри за броматологију Медицинског факултета у Бањој Луци где учествује у извођењу практичне наставе и у научно – истраживачком раду са студентима. У својству сарадника учествовала је у више националних и једном ЕРАСМУС+ пројекту. Специјалистичке академске студије за нутриционисту завршила 2021. године у Центру за интердисциплинарне студије Универзитета у Сарајеву. Докторске академске студије – модул броматологија на Универзитету у Београду – Фармацеутском факултету уписала је школске 2017/2018. године.

## 10 ИЗЈАВЕ

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Нина Окука

Број индекса 12/17

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај комбинације два пробиотска соја и поликозанола на метаболичке параметре код гојазних жена“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

---

У Београду, 15.11.2024.



## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Нина Окука

Број индекса 12/17

Студијски програм Докторске академске студије – модул Броматологија

Наслов рада „Утицај комбинације два пробиотска соја и поликозанола на метаболичке параметре код гојазних жена“

Ментори – др сц. Брижита Ђорђевић, редовни професор и др сц. Невена Ивановић, ванредни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

---

У Београду, 15.11.2024.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утицај комбинације два пробиотска соја и поликозанола на метаболичке параметре код гојазних жена“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY – NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY – NC – ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY – NC – SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY – ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY – SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

---

У Београду, 15.11.2024.

1. **Ауторство.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.