

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ -
ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА
КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ**

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета, одржаној **17.10.2024.** године, на основу молбе ментора, др сц. Брижите Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет и др сц. Невене Ивановић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације магистра фармације **Нине Ж. Окуке**, вишег асистента, Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, под насловом: „**Утицај комбинације два пробиотска соја и поликозанола на метаболичке параметре код гојазних жена**“, у саставу:

1. Др сц. Неда Милинковић – доцент, Катедра за медицинску биохемију, Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду,
2. Др сц. Мирјана Шумарац Думановић – редовни професор, Клиника за ендокринологију, дијабетес и метаболичке поремећаје, Универзитетски клинички центар Србије, Медицински факултет, Универзитет у Београду,
3. Прим. др сц. Снежана Половина – виши научни сарадник, Клиника за ендокринологију, дијабетес и метаболичке поремећаје, Клинички центар Србије, Медицински факултет, Универзитет у Београду,
4. Др сц. Рајна Милић – научни саветник, Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Горлак“,
5. Др сц. Ксенија Величковић – доцент, Катедра за биологију ћелије и ткива, Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

А Основни подаци о кандидату

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 је 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.

Б Наслов дисертације

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

В Обим дисертације

Дисертација је написана на 108 страна и садржи седам поглавља: 1 Увод, 2 Циљеви истраживања, 3 Испитаници и методе, 4 Резултати, 5 Дискусија, 6 Закључци и 7 Литература. Дисертација садржи укупно 24 слике (12 у поглављу Увод, 1 у поглављу Испитаници и методе, и 11 у поглављу Резултати) и 11 табела (2 у поглављу Увод и 9 у поглављу Резултати истраживања). У поглављу Литература је цитирано 330 литературних навода. На почетку докторске дисертације су изводи на српском и енглеском језику, затим следи садржај, док се на крају докторске дисертације налазе кратка биографија кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације (обавезни Прилози 1, 2 и 3).

Г. Библиографски подаци

Нина Окука је до сада објавила два научна рада у часописима међународног значаја категорије М21. На научним скуповима међународног и националног значаја учествовала је са 5 научних радова штампаних у изводу.

2. Предмет и циљ дисертације

Предмет ове докторске дисертације је процена ефикасности комбинације два пробиотска соја, *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (DSM9843) и *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* (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. Како би се испитао утицај два пробиотска соја и октакозанола код гојазних испитаница у репродуктивном периоду, од 25 до 50 година старости, са индексом телесне масе (ИТМ) = $30 - 39,9 \text{ kg m}^{-2}$ (гојазност тип 1 и 2) истраживање је спроведено постављањем наредних циљева. Први циљ је био испитати утицај пробиотске формулације на антропометријске параметре, и то првенствено утицај на телесну масу, индекс телесне масе и проценат укупне телесне масти. Надаље, циљ је био испитати и утицај на основне метаболичке параметре који подразумевају гликемијски и липидни профил испитаница. Посматрајући масно ткиво као ендокрини орган, циљ је био испитати и утицај пробиотске формулације на ниво адипокина (лептин и адипонектин), као и на ниво грелина. Од посебног значаја је било испитати и утицај на параметре инфламације, попут *IL-6*, *IL-17*, *TNF- α* и *CRP*. Циљ је био испитати и утицај пробиотске формулације на хематолошке параметре и одабране параметре целуларног и хуморалног имунитета. Последњи циљ је био испитати да ли након дијетарне интервенције долази до промена у експресији епигенетских маркера повезаних са гојазношћу.

3. Основне хипотезе

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су заснована на хипотези да дисбиоза присутна код гојазних особа има улогу у повећању телесне масе и настанку метаболичких поремећаја. Стога је постављена хипотеза да ће суплементација са комбинацијом два пробиотска соја и октакозанолом који има хипохолестеролемијско деловање имати синергистички ефекат на параметре липидног профила. С обзиром на то да је *diabetes mellitus* тип 2 (ДМ тип 2) веома често присутан код гојазних особа, постављена је хипотеза да ће пробиотска формулација имати позитиван утицај и на нивое глукозе и инсулина. Узимајући у обзир да је гастроинтестинална микробиота значајан регулатор апетита, постављена је хипотеза да ће након дијетарне интервенције која садржи пробиотику доћи и до регулације нивоа хормона који утичу на апетит, попут грелина, лептина и адипонектина. Знајући да је гојазност обољење које се карактерише хроничном инфламацијом ниског степена праћен је и утицај пробиотске формулације на параметре инфламације. Даље, захваљујући имуномодулаторном ефекту пробиотика, постављена је хипотеза да ће након дијетарне интервенције доћи до промене одређених параметара хуморалног и целуларног имунитета. Знајући да животне навике могу имати утицај на експресију малих некодирајућих молекула рибонуклеинске киселине (РНК) (енгл. *micro Ribonucleic Acid microRNA, miRNA*) и то да ове молекуле управо представљају један од механизма деловања пробиотика, постављена је хипотеза да ће суплементација пробиотском формулацијом резултовати променама у експресији *microRNA* повезаних са гојазношћу.

4. Приказ садржаја докторске дисертације

Увод даје детаљан приказ досадашњих сазнања из области које су непосредно везане за предмет ове докторске дисертације, а састоји се од осам делова. На почетку увода направљен је осврт на дефиницију и озбиљност гојазности као обољења које поприма пандемијске размере, а које представља ризик од оболевања од других метаболичких и кардиоваскуларних обољења. Потом је детаљно описана патофизиологија гојазности, као и промене на нивоу ћелија масног ткива, адипоцита, које су присутне код гојазних индивидуа. Наиме, повишен интраћелијски садржај липида доводи и до пораста величине (хипертрофија) и до пораста броја (хиперплазија) адипоцита. 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 α (енгл. *Tumour Necrosis Factor α , TNF- α*), адипсин, метаболите попут слободних масних киселина и лактата, док је продукција антиинфламаторних цитокина и адипонектина снижена. Наведене промене у метаболизму могу довести до других поремећаја, као што су дислипидемија, хипертензија, хиперинсулинемија и ДМ тип 2. Осим тога, повећана маса масног ткива код гојазних особа, без адекватне васкуларизације, може довести до хипоксије, инфилтрације макрофага и процеса инфламације. Осим повећаног калоријског уноса, седентарног начина живота, постоје докази који указују на то да гојазност може бити последица генетске предиспозиције, али и епигенетске модификације попут метилације ДНК, модификације некодирајућих РНК и хистона. У другом делу увода описује се терапија гојазности која подразумева првенствено промене животних навика (смањење енергетског уноса и повећање енергетске потрошње кроз уравнотежену исхрану и повећану физичку активност), али у одређеним случајевима примену лекова за редукацију телесне масе и хируршке интервенције попут гастричног бајпаса. Трећи дио увода говори о гастроинтестиналној микробиоти, о њеном саставу и значајној улози у нормалном функционисању гастроинтестиналног тракта (ГИТ), али и у одржавању хомеостазе комплетног организма захваљујући протективној, структурној и метаболичкој улози. Четврти део увода се односи на повезаност ГИ микробиоте и гојазности. 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. Анималне и хумане студије су показале да гојазне индивидуе имају повећан однос *Firmicutes/Bacteroidetes (F/B)*, као и то да је гојазни фенотип повезан са већом продукцијом кратколанчаних масних киселина у поређењу са фенотипом нормалне телесне масе. Пети дио увода се односи на пробиотику и њихов механизам деловања. У том делу се, на основу досадашње литературе, истиче да би једно од циљних места у третману гојазности требало да буде микробиота, односно примена пробиотика у циљу третмана дисбиозе карактеристичне за гојазне особе. Сматра се да пробиотици попут *Lactobacillus* врста/сојева имају снижавајући ефекат на концентрације глукозе у крви, и то на тај начин што редукују концентрације инфламаторних маркера и инсулинску резистенцију тако што регулишу глукагон-сигналишуће путеве и састав ГИ микробиоте. Позитиван ефекат на липидни профил *Lactobacillus* врсте/сојеви испољавају регулишући метаболизам жучних соли и експресију транспортера липида. Суплементација пробиотикама, посебно сојем *L. plantarum 299v*, 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, док је смањење концентрације триглицерида уочено и при нижим дозама *L. plantarum*. Сматра се да су наведени повољни ефекти последица продукције кратколанчаних масних киселина (енгл. *Short Chain Fatty Acid, SCFA*), попут пропионата и бутирата, али и промене састава микробиоте након примене *L. plantarum* пробиотика. 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. У овом делу је описан и имуномодулаторни ефекат пробиотика, као и њихов утицај на промене хематолошких параметара карактеристичних за еритроците и тромбоците. Такође, описује се и утицај пробиотика на епигенетске маркере повезане са гојазношћу. Завршни сегмент овог дела увода говори о критеријумима које један микроорганизам мора да испуни како би се окарактерисао као пробиотски сој, те шта значи *GRAS (Generally Recognized As Safe)* и *QPS (Qualified Presumption Safety)* статус. Последња три дела увода се односе на карактеристике појединачних компоненти (*L. plantarum* 299v, *S. boulardii* и октакозанол) коришћених у саставу пробиотске формулације, као и на њихове механизме деловања.

Поглавље **Испитаници и методе** има пет делова, од који се први односи на избор испитаница, дизајн и протокол студије. Описан је почетак истраживања који је обухватао одабир потенцијалних учесника студије уз поштовање критеријума за укључивање, односно искључивање из студије. 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). 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 АСТРН12622000696796). У току студије спроведене су две посете, прва посета дан пре почетка интервенције, а друга посета након завршене интервенције која је трајала 12 недеља. У другом делу овог поглавља описан је материјал коришћен за дијетрану интервенцију. Интервентна група је једанпут дневно пила по 1 капсулу након доручка која садржи 7×10^{10} CFU *L. plantarum* 299v (*DSM9843*), 5×10^9 CFU *S. 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. Трећи део овог поглавља се односи на узорковање биолошког материјала, који се обавио у просторијама Клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма Универзитетско-Клиничког Центра Србије у Београду. Четврти део овог поглавља садржи приказ метода коришћених у истраживању (мерење антропометријских параметара, одређивање основних биохемијских параметара, одређивање адипоцитокина и хормона који имају утицај на

апетит, одређивање хематолошких параметара, одређивање параметара хуморалног и целуларног имунитета, одређивање епигенетских маркера). На крају овог поглавља, описани су статистички тестови који су послужили за анализу добијених резултата коришћењем *SPSS* статистичког програма (*SPSS v. 20.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA*). Вредности $p \leq 0,05$ сматране су статистички значајним за све спроведене анализе.

Поглавље **Резултати** садржи табеларни и графички приказ добијених резултата ове дисертације. Кандидат је приказао оригиналне резултате на јасан и свеобухватан начин кроз 11 слика и 9 табела објашњавајући их личним тумачењем а на основу података публикованих у релевантној литератури. Ово поглавље докторске дисертације садржи следеће делове: 1. Основни демографски подаци; 2. Утицај пробиотске формулације на антропометријске параметре; 3. Дијетарне навике; 4. Утицај пробиотске формулације на метаболичке параметаре; 5. Утицај пробиотске формулације на концентрације адипоцитокина; 6. Утицај пробиотске формулације на концентрације хормона који имају утицај на апетит; 7. Утицај пробиотске формулације на хематолошке параметре; 8. Утицај пробиотске формулације на одабране параметре хуморалног и целуларног имунитета; 9. Утицај пробиотске формулације на епигенетске маркере.

У поглављу **Дискусија** прокоментарисани су добијени резултати у складу са доступном литературом и сазнањима.

На крају дисертације дати су **Закључци** који произилазе из анализе добијених резултата, а у складу су са постављеним циљевима докторске дисертације.

У поглављу **Литература** наведено је 330 референци (Ванкуверски стил цитирања).

5. Остварени резултати и научни допринос докторске дисертације

Вредности основних демографских података, као ни дијетарне навике испитаница нису се статистички значајно разликовале између контролне и интервентне групе. 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 наведених антропометријских параметара 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.

У наредном делу резултата докторске дисертације приказане су вредности глукозе, инсулина и липидних параметара, на почетку и након 12 недеља дијетарне интервенције. На базалном нивоу, односно на почетку студије нису уочене статистички значајне разлике анализираних параметара између контролне и интервентне групе. 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.

Надаље, приказане су вредности анализираних адипоцитокина на 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 интеракције 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- α* нису се статистички значајно промениле након 12 недеља дијетарне интервенције нити у једној групи.

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. Иако на базалном нивоу није било разлике између група у концентрацијама испитиваних параметара, 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. Испитивањем потенцијалних корелација адипоцитокина, хормона који регулишу апетити и метаболичких параметара, у интервентној групи концентрације лептина показале су статистички значајну позитивну корелацију са концентрацијама *IL-6* ($r = 0,586$, $p = 0,003$) на крају интервенције. 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.

Када су у питању хематолошки параметри, на базалном нивоу 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 (T0 и T1). Суплементација новом пробиотском формулацијом довела је до повећања *PDW* вредности у интервентној у поређењу са

контролном групом. Иако наведена промена није достигла статистичку значајност, истакнуто је да су у интервентној групи након дијетарне интервенције вредности *PDW* скоро достигле референтне вредности. У овом делу су израчунате и процентуалне промене хематолошких параметара еритроцита и тромбоцита, односно крвних плочица, које су представљене као делта (Δ) вредности. Резултати су показали да се након 12 недеља дијетарне интервенције, вредности параметара карактеристичних за еритроците нису значајно промениле нити у једној испитиваној групи. Највеће промене које су биле уочене између контролне и интервентне групе односиле су се на *RDW* вредности ($-10,56 \pm 5,11$; $p = 0,055$). Приказане су и процентуалне промене параметара карактеристичних за тромбоците, које се након 12 недеља дијетарне интервенције нису значајно промениле. Иако без статистичке значајности, највеће промене уочене за *PDW* вредности ($-5,110 \pm 5,98$).

Морфолошка анализа крвних размаза узорака показала је у поређењу са базалним нивоом, али и у поређењу са контролном групом, смањење појаве морфолошких абнормалности еритроцита у интервентној групи након дијетарне интервенције. Даље анализе укључивале су испитивање морфолошких промена тромбоцита, који су се разликовали у величини, облику и изгледу гранула. Базирано на њиховим морфолошким карактеристикама, разликовали су се гранулирани, хипогранулирани и активирани тромбоцити. Даља морфометријска анализа је показала значајне статистичке промене 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. Истакнуто је и значајно снижење ($p < 0,05$) процента активираних крвних плочица након интервенције пробиотском формулацијом. Иако не статистички значајно, након дијетарне интервенције уочен је тренд смањења дијаметра крвних плочица у поређењу са величином на базалном нивоу.

Анализом утицаја пробиотске формулације на ниво фибриногена и *sP-selectin* може се рећи да се концентрације анализираних параметара нису промениле унутар или између група. Када су се посматрале процентуалне промене 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* ($-5,05 \pm 9,98$). Испитивањем корелације између ИТМ и хематолошких параметара, статистички значајна негативна корелација уочена је између вредности Δ ИТМ и Δ PDW у интервентној групи ($r = -0,5904$, $p = 0,049$). Умерена негативна корелација постојала је између Δ ИТМ и Δ MCH ($r = -0,452$, $p = 0,067$), као и између Δ ИТМ и Δ 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 па достигле референтне вредности. Иако не статистички значајно, сличан тренд примећен је и за *MCH* и *MCHC* вредности.

Како би се испитао утицај пробиотске формулације на одабране параметре хуморалног имунитета одређени су нивои антитела специфичних на микроорганизме коришћене у студији. Резултати нису показали значајне промене нивоа антимикуробних *IgG*, *IgG1*, *IgG2* и *IgA* антитела специфичних за *S. boulardii* и *L. plantarum 299v*, између група, као ни током времена. Анализа субпопулација лимфоцита у периферној крви урађена је како би се испитао утицај дијетарне интервенције на параметре целуларног имунитета. Значајне промене у процентима $CD3^+CD4^+$ Т ћелијама између група, као ни током времена унутар појединачних група, нису забележене, али је откривено значајно смањење процента

$CD3^+CD8^+$ ћелија у интервентној групи у Т1 тачки ($p = 0,043$). Заступљеност $CD3^+CD56^+$ и $CD3^-CD56^+$ ћелија такође се није значајно разликовала између или унутар група како пре тако ни на крају интервенције. Међутим, уочено је значајно смањење нивоа $CD4^+CD45^+$ лимфоцита у интервентној групи након 12 недеља интервенције ($p = 0,043$). Испитивањем утицаја суплементације на ниво $TGF-\beta 1$, уочен је тренд пораста укупног $TGF-\beta 1$ како у интервентној групи, тако и између плацебо и интервентне групе након интервенције, али само приликом уклањања екстремних вредности из обе групе. Даља анализа је подразумевала проверу утицаја суплементације на секрецију цитокина након *in vitro* стимулације ћелија периферне крви. У поређењу са нестимулисаним ћелијама, до промене у концентрацијама цитокина $TNF-\alpha$ и $IL-6$, дошло је само приликом стимулације липополисахаридом. Међутим, нису примећене значајне разлике у концентрацијама $IL-6$ и $TNF-\alpha$ након стимулације ћелија периферне крви липополисахаридом, између група, као ни кроз време.

У последњем делу овог поглавља приказани су резултати утицаја суплементације на експресију испитиваних епигенетских маркера одређених из капиларне крви. Након 12 недеља суплементације дошло је до значајног снижења експресије $miR-155-5p$ ($p = 0,040$), $miR-125b-5p$ ($p = 0,049$) и $TNF-\alpha mRNA$ ($p = 0,009$) у интервентној групи, док је тренд снижења експресије уочен за $miR-26b-5p$ ($p = 0,067$). 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, као ни кроз време. Даља испитивања су показала постојање позитивне корелације 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 $miR-24-3p$.

6. Упоредна анализа резултата кандидата са подацима из литературе

Узимајући у обзир позитивну корелацију дисбиозе ГИ микробиоте са повећаним ИТМ и придруженим коморбидитетима, у оквиру ове докторске дисертације испитиван је утицај суплементације комбинацијом пробиотика и октакозанола на метаболичке и друге параметре нарушене код гојазних особа. Постоје различите информације у литератури о утицају пробиотика на ТМ, од скромног ефекта на губитак ТМ код особа са прекомерном ТМ и гојазних особа (1, 2), изостанка утицаја на ТМ, па до повећања ТМ након примене одређених *Lactobacillus* врста (3, 4). Резултати ове докторске дисертације нису указали на значајност промене ТМ након примене пробиотске формулације, истичући да пробиотици првенствено утичу на регулацију метаболичких параметара и параметара инфламације, уско повезаних са гојазношћу и коморбидитетима који прате гојазност.

Познато је да *Lactobacillus* врсте/сојеви имају утицај на смањење концентрација холестерола и триглицерида захваљујући деконјугацији жучних соли и продукцији *SCFA*, посебно пропионата (5, 6). Повећан ефекат на концентрације холестерола код гојазних особа се остварује применом високих доза пробиотика ($\geq 10^{10}$ CFU/дан) у временском периоду од 12 недеља (5), што је у складу са режимом дозирања и трајања интервенције у склопу ове докторске дисертације. *S. boulardii* такође утиче на регулацију липидног

профила захваљујући способности ћелијског зида да апсорбује холестерол и индиректном утицају на ГИ микробиоту (7). Октакозанол делује хипохолестеролемијски смањујући активност *HMG-CoA*-редуктазе активацијом *AMP* киназе (8-10), а инхибицијом холестерол естар трансферног протеина доводи до повећања концентрација *HDL*-холестерола (11). У складу са недавно спроведеном студијом (12), резултати ове студије нису показали значајан ефекат на концентрације укупног и *LDL*-холестерола након 12 недеља примене пробиотика и октакозанола, док је у интервентној групи уочен опадајући тренд концентрације триглицерида. Међутим концентрације *HDL*-холестерола су значајно порасле након дијетарне интервенције. Управо због повећања концентрација *HDL*-холестерола, примена пробиотске формулације би се могла узети у обзир као ефикасна стратегија у превенцији настанка кардиоваскуларних обољења и дијабетеса, обољења која су често удружена са гојазношћу (13). Узимајући у обзир то да је гојазност веома често повезана са повећаном инциденцом оболевања од ДМ тип 2 (14), као и да промене у саставу ГИ микробиоте значајно доприносе повећању инциденце инсулинске резистенције, а самим тим и оболевања од ДМ тип 2 (15), испитан је и ефекат пробиотске формулације на концентрације глукозе и инсулина у крви. Оба параметра су показала опадајући тренд концентрација након интервенције пробиотском формулацијом услед чега су се концентрације глукозе снизиле на референтне вредности. Прегледом литературе установљено је да примена пробиотика доводи до регулације нивоа глукозе и инсулина у крви (16), што се сматра резултатом поновног успостављања баланса ГИ флоре услед промене састава ГИ микробиоте након примене пробиотика, тако да је пораст нивоа инсулина одложен или превениран (17).

Стање хроничне инфламације ниског степена присутне код гојазних особа се огледа у повећаним концентрацијама маркера системске инфламације, попут *TNF- α* , *IL-6* и *CRP* (18), а сматра се последицом нарушеног састава ГИ микробиоте услед чега долази до нарушавања интегритета мукозне баријере и повећања оксидативног стреса (19). Концентрације маркера инфламације попут *TNF- α* , *IL-6* и *CRP* су значајно више код гојазних у поређењу са особама нормалне телесне масе (20, 21). У складу са тим подацима, и у овој студији су вредности *CRP* у обе групе 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) (22). Резултати ове дисертације су показали да су се након 12 недеља дијетарне интервенције, концентрације *CRP* и *IL-6* у крви испитаница интервентне групе значајно снизиле у поређењу са концентрацијама измереним пре почетка студије. Такође, у поређењу са контролном групом, концентрације *CRP* након периода суплементације биле су значајно ниже у интервентној групи. Подаци из доступне литературе указују на способност пробиотика да сниже вредности *CRP* код особа са прекомерном ТМ, али у комбинацији са изокалоријском дијетом (19). Студија спроведена од стране *Zarrati* и сар. је показала да концентрације *CRP* опадају значајно више у групи која је конзумирала пробиотски јогурт (*Lactobacillus acidophilus La5*, *Bifidobacterium BB12*, и *Lactocaseibacillus casei DN001*, 1×10^8 CFU/g) него у групама у којима је конзумиран само јогурт или пробиотски јогурт у комбинацији са нискокалоријским режимом исхране (23). Споменуте студије су трајале 8 недеља. Упркос разлици у трајању студије, као и у различитим пробиотским сојевима који су коришћени за интервенцију, резултати ове докторске дисертације су потврдили да пробиотска формулација може имати корисне ефекте на регулацију концентрација *CRP* чак и без дијетарне интервенције. 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 показали смањење концентрација *IL-6*, још једном указујући на антиинфламаторни ефекат наведене формулације. Анималне студије су показале значајно смањење концентрација проинфламаторних цитокина, попут *IL-6*, након третирања гојазних мишева/пацова пробиотским сојевима *L. plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum* или *L. casei* (24, 25). Додатно, *S. boulardii* такође је довео до снижења концентрација *IL-6* у плазми гојазних мишева оболелих од *diabetes mellitus* типа 2 (26). Иако су испитивана скупина били дијабетичари, литературни подаци указују на то да *Lactiplantibacillus* сојеви могу утицати на концентрације *IL-6* (14). 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), ни у овој студији нису уочене статистички значајне промене у концентрацијама *TNF-α* након интервенције пробиотском формулацијом (27, 28). Иако су одређене анималне и хумане студије показале да постоји потенцијални ефекат пробиотика на снижење концентрације *IL-17* (25, 29), у овој студији је изостао ефекат суплементације на вредности овог маркера. Кандидат могуће објашњење за наведене резултате проналази 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 су овој студији за анализу коришћени узорци серума (29).

Познато је да пробиотици испољавају позитиван ефекат на нивое хормона који регулишу апетит попут грелина, лептина и адипонектина (30), чије су вредности веома често промењене код гојазних особа услед прекомерне масе масног ткива и присуства хроничне инфламације ниског степена (30-32). Повишене концентрације лептина примећене су у крви гојазних мишева и људи, што заправо представља лептинску резистенцију која значајно доприноси настанку метаболичких поремећаја (33). Резултати ове докторске дисертације 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* (34). Сматра се да пробиотици доводе до снижења концентрација лептина тако што смањују експресију *mRNA* лептина у хипоталамусу (31), али и инхибицијом експресије *PPAR-γ*, једног од главних регулатора адипогенезе, што последично доводи до смањене секреције лептина од стране масног ткива (31, 35, 36). Након интервенције са пробиотском формулацијом, нису уочене значајне промене у концентрацијама адипонектина унутар, као ни између група, што је у складу са доступном литературом (30, 34, 37). Заправо, сматра се да пробиотици не утичу на масно ткиво у толикој мери која би довела до промене концентрација адипонектина. *Shiyya* и сар. су приметили да су концентрације грелина ниже код гојазних особа у поређењу са особама нормалне телесне масе (32). Резултати ове студије су показали да концентрације грелина зависе и од третмана и дужине трајања интервенције, као и то да су концентрације грелина биле значајно више у интервентној групи након 12 недеља суплементације. Сматра се да пробиотици доводе до повећања нивоа тако што утичу 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. Међутим, резултати ове докторске дисертације указују на потенцијални ефекат пробиотске формулације на хормоне који регулишу апетит, што захтева додатна испитивања у смислу доза, дужине интервенције и пробиотских сојева коришћених за интервенцију.

Познато је да повећање телесне масе доводи до повећања броја леукоцита, тромбоцита, али и повећане агрегације еритроцита (38-40). 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 крвних плочица (41). Анализом хематолошких параметара може се рећи да интервенција пробиотском формулацијом има позитиван учинак на величину и облик еритроцита и крвних плочица, као и на обојеност еритроцита. У овој студији није доказан утицај интервенције на вредности фибриногена и *sP-selectin*. Корелационом анализом установљено је да су испитанице које су изгубиле више килограма након интервенције тромбоцити били униформнији, као и да је код тих испитаница дошло до побољшања садржаја (*MCH*) и концентрације (*MCHC*) хемоглобина у еритроцитима.

Познато је да 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 ове студије су показали да примена пробиотске формулације доводи до смањења процента $CD3^+CD8^+$ ћелија, док је утицај на проценат $CD3^+CD4^+$ ћелија изостао. Да пробиотици регулишу имунски одговор утицајем на заступљеност субпопулација Т-лимфоцита у периферној крви потврђују и анималне студије (42, 43). Тако је примена *L. johnsonii* BS15 значајно повећала проценат $CD3^+CD4^+$, док је проценат $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцита био снижен. Након 12 недеља суплементације пробиотском формулацијом је уочено значајно смањење процента меморијских Т помоћничких ћелија, $CD4^+CD45RO^+$. Супротно томе, 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 (44). Забележен је тренд раста броја циркулишућих $CD3^+CD56^+$ ћелија након дијетарне интервенције, међутим без статистичке значајности. Постоје студије које истичу да пробиотици имају утицај на активност $CD56^+$ ћелија (45, 46), док Seifert и сар. нису уочили значајан ефекат пробиотика (*L. casei* Shirota) на експресију и функцију $CD3^+CD56^+$ ћелија (47). Истакнуто је и да је након примене пробиотске формулације дошло до стимулације продукције *TGF-β1*, што је у складу са *in vitro*, *in vivo* и хуманим студијама (48-50).

Истраживања у склопу ове докторске дисертације представљају прву студију која је изучавала ефекат пробиотске формулације на експресију *miR-155* код гојазних особа, а резултовала је значајно нижом експресијом *miR-155*, чија је експресија повишена код гојазних особа. Такође, 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. У складу са анималним студијама (51, 52), резултати ове студије су показали да пробиотска формулација доводи до смањења експресије *TNF*.

7. Литература

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Banerjee S, Ghoshal S, Porter TD. Activation of AMP-kinase by policosanol requires peroxisomal metabolism. *Lipids*. 2011;46:311-21.
9. Patrocinio 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. 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.
16. 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).
17. 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.
18. Karczewski J, Śledzińska E, Baturó A, Jończyk I, Maleszko A, Samborski P, et al. Obesity and inflammation. *European cytokine network*. 2018;29:83-94.
19. Nasiri G, Bastani A, Haji-Aghamohammadi AA, Nooshabadi MR, Shahmirzalou P, Haghhighian 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.
20. 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.
21. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diabetes research and clinical practice*. 2005;69(1):29-35.
22. Nehring SM, Goyal A, Patel BC. C reactive protein. 2017.
23. 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.
24. 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.
25. Núñez IN, Galdeano CM, de LeBlanc AdM, Perdigon G. *Lactobacillus casei* CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. *Nutrition*. 2015;31(7-8):1000-7.
26. 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.
27. 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.
28. 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.

29. 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.
30. 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.
31. Noormohammadi M, Ghorbani Z, Löber U, Mahdavi-Roshan M, Bartolomaeus 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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- α/γ signaling pathway. *Journal of Functional Foods*. 2020;75:104264.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Hotoleanu C. Association between obesity and venous thromboembolism. *Medicine and pharmacy reports*. 2020;93(2):162.
42. 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.

43. 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.
44. Rask C, Adlerberth I, Berggren A, Åhrén 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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 Activity1–3. *The Journal of nutrition*. 2011;141(5):978-84.
48. 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.
49. 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.
50. Kusumo PD, Bela B, Wibowo H, Munasir Z, Suroño 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.
51. 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.
52. 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.

8. Закључак са образложењем научног доприноса докторске дисертације

Детаљном анализом приложене докторске дисертације Комисија је констатовала да је дисертација приказана на јасан и прегледан начин и да су сви постављени циљеви у потпуности реализовани. Истраживање је организовано и спроведено у складу са савременим стандардима истраживања која укључују дијетарне интервенције у области броматологије.

Резултати представљени у дисертацији на оригиналан начин приказују утицај пробиотске формулације која садржи комбинацију два пробиотска соја и октакозанола на одабране параметре код гојазних особа. У оквиру дисертације, у циљу проналаска новог додатка исхрани који би био адекватна нутритивна подршка у третману гојазности, анализиран је утицај пробиотске формулације на антропометријске и метаболичке параметре чије су

вредности промењене код гојазних особа, где је утврђен позитиван ефекат на вредности кардиопротективног *HDL*-холестерола у крви, као и потенцијални ефекат на концентрације триглицерида, глукозе и инсулина. Испитивањем утицаја суплементације на концентрације адипоцитокина уочен је значајан ефекат на снижење концентрација *CRP*-а и *IL-6*, указујући на антиинфламаторни потенцијал пробиотске формулације. Установљено је да пробиотици имају минималан ефекат на концентрације хормона који регулишу апетит, као и то да је након дијетарне интервенције дошло до повећања концентрација грелина, хормона чије су вредности снижене код гојазних особа. Испитивањем промена хематолошких параметара, након суплементације пробиотском формулацијом установљен је позитиван ефекат на морфолошке карактеристике еритроцита и тромбоцита. Забележен је и ефекат на заступљеност субпопулација Т-лимфоцита у периферној крви, који се огледа у смањеном проценту цитотоксичних $CD3^+CD8^+$ Т-ћелија и смањеном проценту $CD4^+CD45RO^+$ меморијских Т-помоћничких ћелија. Дијетарна интервенција је довела и до промена експресије одређених епигенетских маркера, значајних у процесима адипогенезе и инфламације, попут *miR-155-5p* и *miR-24-3p* чија је експресија била значајно нижа након периода суплементације. На основу остварених ефеката пробиотске формулације на епигенетске маркере, може се закључити да пробиотици захваљујући утицају на експресију *miRNA* и *mRNA*, остварују индиректан ефекат и на процесе адипогенезе и инфламаторног одговора.

9. Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Утицај комбинације два пробиотска соја и поликозанола на метаболичке параметре код гојазних жена“, аутора Нине Ж. Окуке, констатује се да утврђено подударане текста износи 6%.

Овај степен подударности последица је коришћења тачно дефинисаних назива и општих места, библиографских података односно навођења коришћене литературе, као и података из претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

M20

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).

<https://doi.org/10.3390/life13091912>

IF (2023) = 3,2; Biology (25/90); M21

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.

<https://doi.org/10.1039/D4FO01269K>

IF (2023) = 5,1; Food Science & Technology (30/141); M21

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*, 12-14th 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 - 14th International Congress of Nutrition: „A place where science meets practice“*. 8 - 10th 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 - 14th International Congress of Nutrition: „A place where science meets practice“*. 8-10th 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 – 12th November 2023, Sarajevo; Abstract book, 78-79.

M64

1. Veličković K, **Okuka N**, Polovina S, Šumarac-Dumanović M, Ivanović N, Milinković N, Đorđević B. Effects of probiotic supplementation on platelet morphology in overweight/obese woman. *8th Congress of Pharmacists of Serbia with international participation*, 12-15th October 2022, Belgrade; 72: S509-S510.

Мишљење и предлог Комисије

На основу свега изложеног, Комисија сматра да је маг. фарм. Нина Окука остварила постављене истраживачке циљеве и да резултати ове докторске дисертације представљају оригиналан и значајан научни допринос, што је потврђено њиховим објављивањем у два рада у међународним часописима.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај о завршеној докторској дисертацији маг. фарм. Нине Окуке под називом „**Утицај комбинације два пробиотска соја и поликозанола на метаболичке параметре код гојазних жена**“ и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану.

КОМИСИЈА:

У Београду, 15.11.2024. године

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

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

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. Рајна Минић – научни саветник,
Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“

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