

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУРШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/153

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

04.07.2023.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације
и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

Утицај дијететских суплемената на бази пробиотика и полифенола на састав микробиоте
човека

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

Ана (Небојша) Бачић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Мастер студије, Мастер инжењер технологије

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2020.

4. Година уписа на докторске студије: 2020.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ :

Име и презиме ментора: др Мирјана Рајилић-Стојановић

Звање: Ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Rajilić-Stojanović M** & de Vos WM (2014) The First 1000 Cultured Species of the Human Gastrointestinal Microbiota. FEMS Microbiol. Rev. 38(5):996-1047 doi: 10.1111/1574-6976.12075 (Wiley Blackwell ISSN: 1574-6976) IF (2021) 15.177
2. **Rajilic-Stojanovic M**, Figueiredo C, Smet A, Hansen R, Kupcinskas J, Rokkas T, Andersen L, Machado JC, Ianiro G, Gasbarrini A, Leja M, Gisbert JP, Hold GL (2020) Systematic review: gastric microbiota in health and disease Aliment Pharmacol Ther 51(6):582-602. doi: 10.1111/apt.15650. (Wiley ISSN 0269-2813) IF(2021) 9.524.
3. Milutinović M, Radovanović N, Ćorović M, Šiler-Marinković S, Rajilić-Stojanović M, Dimitrijević-Branković S (2015) Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust Ind. Crop. Prod. 77:333-341 doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.007 (Elsevier ISSN: 0926-6690) IF (2021): 6.449
4. Milutinović M, Miladinović M, Gašić U, Dimitrijević-Branković S, **Rajilić-Stojanović M** (2022) Recovery of bioactive molecules from *Hypericum perforatum* L. dust using microwave-assisted extraction Biomass Convers Bior doi.org/10.1007/s13399-022-02717-5 (Springer, ISBN 2190-6815) IF(2021) 4.050
5. Milutinović M, Dimitrijević-Branković S & **Rajilić-Stojanović M** (2021) Plant extracts rich in polyphenols as potent modulators in the growth of probiotic and pathogenic intestinal microorganisms Front. Nutr. doi: 10.3389/fnut.2021.688843 (Frontiers 2296-861X) IF(2021) 6.590

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Петар Ускоковић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл. 43. Правилника о докторским студијама ТМФ-а на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 29.06.2023. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата
за израду докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације **Ане Бачић**, број индекса 4001/20, под називом: **„Утицај дијететских суплемената на бази пробиотика и полифенола на састав микробиоте човека“**.

Одлуку о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације доноси Универзитет у Београду.

За ментора се одређује др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Одлуку доставити: Универзитету у Београду, кандидату, ментору, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Технолошко-металуршки факултет

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Ане Бачић, мастер инжењера технологије за израду докторске дисертације

Одлуком Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета бр. 35/91 од 11.05.2023. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Ане Бачић за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом **„Утицај дијететских суплемената на бази пробиотика и полифенола на састав микробиоте човека“**.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следеће:

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1 Биографски подаци

Ана Бачић, мастер инжењер технологије, рођена је 25.08.1994. године у Смедереву, где је завршила основну и средњу школу. Интегрисане академске студије на Фармацеутском факултету, студијски програм Фармација - медицинска биохемија, уписала је школске 2013/14, а завршила је у септембру 2018. године са просечном оценом 9,68. Дипломски рад под насловом „Оксидоване липопротеинске честице високе густине у метаболичком синдрому” одбранила је на Катедри за медицинску биохемију оценом 10, а потом је одрадила приправнички стаж у медицинско-биохемијској лабораторији у оквиру Клиничко-болничког центра „Др Драгиша Мишовић“ и стручни испит положила у септембру 2019. године. Школске 2019/2020. уписала је мастер академске студије на Технолошко-металуршком факултету, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија, које је завршила са просечном оценом 10 и завршни мастер рад на тему „Анализа утицаја избора референтне базе секвенци и методе секвенцирања 16S рРНК кодирајућег гена на резултат анализе састава цревне микробиоте” одбранила у септембру 2020. оценом 10.

Докторске академске студије уписала је школске 2020/2021. на Технолошко-металуршком факултету, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија, под менторством проф. др Мирјане Рајилић-Стојановић. Кандидаткиња је одслушала предмете предвиђене планом и програмом докторских студија и положила све предвиђене испите просечном оценом 9,73.

Од фебруара 2021. запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у звању истраживач приправник. Говори енглески језик. Током интегрисаних академских студија, учествовала је у акцијама студентских секција Јавног здравља и Тима Медицинских биохемичара и обавила једномесечну праксу у јулу 2017. године у лабораторији фармацеутске микробиологије у оквиру Медицинског факултета у Гдањску. Области интересовања у оквиру докторских студија обухватају испитивање гастроинтестиналне микробиоте и дисбиозе микробних заједница, као и испитивање могућности модификација микробиоте пробиотицима и пребиотицима нове генерације.

1.2 Сечено научноистраживачко искуство

Ана Бачић, мастер инжењер технологије, од фебруара 2021. запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у Београду као истраживач приправник и ангажована је на пројекту институционалном пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије ТР 34011, као и на иновационом пројекту сарадње науке и привреде под називом „*Boulardii Achillus*“, којим финансира Иновациони фонд Републике Србије. Носилац овог пројекта је компанија Абела Фарм ДОО, а академским тимом у оквиру пројекта руководи проф. др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор Технолошко-металуршког факултета. Кандидаткиња је такође укључена у *Twinning* пројекат „*TwinPrebioEnz*“ који финансира *Horizon Europe*. У току досадашњег рада, кандидаткиња Ана Бачић, показала је самосталност и склоност ка научноистраживачком раду. Кандидаткиња је усмерила свој научноистраживачки рад у области: пребиотици и пробиотици и равнотежа микроорганизама микробиоте.

У оквиру докторских студија положила је 12/12 испита предвиђених студијским програмом са просечном оценом 9,75 и школске 2021/2022. године одбранила Завршни испит под називом „Полифеноли лековитог биља као пребиотици нове генерације и њихов утицај на цревну микробиоту“ оценом 10, пред комисијом у саставу: др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор Технолошко-металуршког факултета; др Дејан Безбрадица, редовни професор Технолошко-металуршког факултета; др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета.

Преглед положених испита на докторским академским студијама са оценама и ЕСПБ бодовима:

Назив предмета	Број ЕСПБ	Оцена
1. Математичка обрада експерименталних података	5	10
2. Одабрана поглавља биохемије-витамини	5	10
3. Одабрани микробиолошки процеси у заштити животне средине	4	10
4. Биохемијска кинетика	5	10
5. Санитарна микробиологија	4	10
6. Хемометрија	5	10
7. Индустриска микробиологија	5	8
8. Имобилисани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	6	10
9. Хемијска кинетика	5	9
10. Структурна анализа органских молекула	6	10
11. Енглески језик	0	10
12. Завршни испит	30	10
• Укупно:	80	9,75

Кандидаткиња је на почетку докторских студија урадила опсежан преглед литературе у области значајној за израду докторске дисертације. Сумирајући утицај различитих фактора на састав цревне микробиоте на основу литературног прегледа, написано је поглавље у монографији од међународног значаја (M13) чији је први аутор кандидаткиња. Кандидаткиња је, такође, учествовала у експерименталном раду и обради резултата неколико завршних радова студената на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију. У оквиру активности пројекта сарадње науке и привреде, кандидаткиња се бавила анализом утицаја појединачних компонената екстракта хајдучке траве на раст пробиотског квасца *Saccharomyces boulardii* и патогеног квасца *Candida albicans*. На основу добијених резултата дефинисан је микс полифенолних једињења хајдучке траве који омогућава симултану стимулацију пробиотског и суперсију патогеног квасца, што је

основни елемент припремљене међународне патентне пријаве. Са циљем утврђивања ефекта дефинисаног микса полифенола, као и самог екстракта хајдучке траве на целокупну микробиоту, кандидаткиња је боравила на стручном усавршавању током маја 2023. године на Мاستрихт универзитету у Холандији у току ког се оспособила за рад на T1M-2 *in vitro* моделу људског дебелог црева. Настављајући област истраживања започету током израде завршног мастер рада, кандидаткиња је похађала два курса у области биоинформатике и то онлајн курс „*Riffomonas Mothur workshop*“ у мају 2021. и „*COST Action CA18131 (ML4Microbiome) Training School*“ у Барселони у октобру 2022. Применом биоинформатичких алата за анализу састава цревне микробиоте на основу секвенце 16S рРНК кодирајућег гена, кандидаткиња је допринела истраживачком раду у оквиру сарадње са Биолошким факултетом Универзитета у Београду. Применом ове анализе утврђен је састав микробиоте експерименталних животиња при третману комплексом витамина Б. Резултати овог истраживања су публиковани у часопису M21 категорије у научном раду на ком је кандидаткиња коаутор. Такође, у оквиру сарадње са Медицинским факултетом Универзитета у Београду, кандидаткиња је анализирала, применом молекуларних метода, присуство патогених квасаца из рода *Candida* у узорцима гастричне микробиоте и статистичким методама анализирала повезаност присуства ових микроорганизама са резистенцијом патогене бактерије *Helicobacter pylori* на третман антибиотицима, што је резултирало публикацијом у часопису категорије M21 на којој је кандидаткиња први аутор.

Списак објављених научних радова и саопштења:

Поглавље у монографији (M13):

1. **Баћић А** & Rajilić-Stojanović M, Microbiota Changes Throughout Life - An Overview, In Reference Module in Food Science, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2021, ISBN 978-0-08-100596-5. doi: 10.1016/B978-0-12-819265-8.00107-8

Радови у врхунским међународним часописима (M21):

1. **Баћић А**, Milivojević V, Petković I, Kekić D, Gajić I, Medić-Brkić B, & Rajilić-Stojanović M. (2023). In search for reasons behind *Helicobacter pylori* eradication failure – assessment of the antibiotics resistance rate and co-existence of *Helicobacter pylori* with *Candida* species. *Journal of Fungi*, 9(3):328. doi: 10.3390/jof9030328 (MDPI, ISSN 2309-608X). IF2021 5.724
2. Mandić M, Mitić K, Nedeljković P, Perić M, Božić B, Lunić T, **Баћић А**, Rajilić-Stojanović M, Peković S, Božić Nedeljković B. Vitamin B complex and experimental autoimmune encephalomyelitis –attenuation of the clinical signs and gut microbiota dysbiosis. *Nutrients*. 2022; 14(6):1273 doi: 10.3390/nu14061273. (MDPI ISBN 2072-6643) IF 2021 6.706

1.3 Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током докторских студија и у оквиру научноистраживачког рада, Ана Бачић, мастер инжењер технологије, показала је склоност и способност за бављење научноистраживачким радом. То се огледа, како у самосталном креирању и реализацији истраживања везаних за тему докторске дисертације, тако и кроз

рад на осталим истраживањима која се изводе у оквиру пројеката на којим је ангажована. Кандидаткиња савесно испуњава поверене задатке у оквиру пројеката, а изведен је и литературни преглед и план, као и припрема експерименталног дела доктората. Такође, из предложене теме дисертације до сада је објављен један рад у врхунском међународном часопису и поглавље у монографији, на којима је кандидаткиња први аутор. Имајући у виду значај резултата насталих у пројекту сарадње науке и привреде, припремљена је међународна патентна пријава, а исти резултати ће бити публиковани у међународном часопису након предаје патентне пријаве, са циљем заштите интелектуалне својине. Кандидаткиња тренутно ради на извођењу експеримената на основу којих се очекује публикација још два научноистраживачка рада у оквиру предложене теме дисертације. Поред експеримената од значаја за предложену дисертацију, кандидаткиња је била укључена у анализу резултата насталих у пројекту којим руководе истраживачи са Биолошког факултета, Универзитета у Београду, што је резултирало објављивањем једног рада у врхунском међународном часопису. На основу биографских података кандидаткиње, њених научних и стручних активности, као и објављених радова, Комисија сматра да је кандидаткиња подобна за ефикасан теоријски и експериментални рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ научног истраживања

Микробиота човека представља комплексан, метаболички активан екосистем, који се састоји од бактерија, вируса, археја и еукарија, и који учествује у бројним процесима у организму и доприноси одржавању здравља, али и развоју болести. Најразноврснија заједница микроорганизама се налази у цревима, са прогресивним порастом броја врста од проксималним ка дисталним деловима гастроинтестиналног тракта. Применом молекуларних метода микробиологије утврђено је да се цревна микробиота сваког појединца састоји од око 500 бактеријских врста, као и да постоје велике интериндивидуалне разлике у структури микробиоте а данас је идентификовано више хиљада бактерија које могу населити човека. Поред бактерија, у екосистему цревне микробиоте присутни су и други микроорганизми који активно ступају међусобне интеракције, као и у интеракције са људским ћелијама. Иако по бројности и разноврсности доминирају чланови бактеријских заједница, и гљивице, односно фунгална микробиота је значајна, али недовољно истражена група микроорганизама која има утицај на одржавање равнотеже микробног екосистема. Најчешће детектовану фунгалну врсту представља опортунистички патоген *Candida albicans*, са процењеном преваленцом од преко 40% популације, док другу важну компоненту фунгалне микробиоте чине гљивице из рода *Saccharomyces*, а посебно је интересантан пробиотски сој квасца *S. cerevisiae* var. *boulardii* који иако не насељава црева човека, има изузатан утицај и на микробиоту и на човека.

Развој метода молекуларне биологије омогућио је истраживање структуре и активности микробних заједница, као и идентификацију чланова микробиоте на нивоу врсте и соја. Данас молекуларне методе представљају незамењиво средство у испитивању цревне микробиоте, а најчешће коришћене су оне које се заснивају на секвенцирању маркер гена 16S рибозомалне РНК за бактерије, или 28S рРНК и ITS региона (*engl. internal transcribed spacer regions*) за гљивице, као и квантативна метода ланчане цикличне полимеризације у

реалном времену (енгл. *quantitative real time PCR, qRT-PCR*). Излазне резултате секвенцирања, у виду необрађених секвенци, неопходно је адекватно обрадити применом биоинформатичких протокола. Формирањем референтних база података о цревним микроорганизмима, као и развојем јавно доступних протокола за анализу добијених секвенци, значајно је олакшана идентификација чланова цревне микробиоте, међутим услед формирања великог броја процедура и хетерогености података, неопходан је опрез приликом тумачења резултата и поређења студија.

Познато је да је очување нормалне функције цревног микробног екосистема неопходно за адекватно функционисање читавог организма, не само за локалне процесе у цревима попут варења. Промена у структури и функцији микробиоте, карактерисана смањењем разноврсности и заступљености одређених, корисних микроорганизама, уз колонизацију патогених врста, означава се као дисбиоза, и она је у корелацији је са бројним патологијама, нарочито са хроничним незаразним болестима чија је инциденца у порасту и у развијеним друштвима. Такође, доказано је и да развој фунгалне дисбиозе може допринети настанку бактеријске дисбиозе која се одликује губитком симбиотске функције са човеком. Резултати истраживања указују на комплексну међузависност чланова микробиоте, те су тако детектовани мешовити биофилмови квасаца и бактерија који ступају у међусобне интеракције, а такође је доказано и постојање ендосимбиотске везе између квасаца и бактерија. Комплексне интеракције између чланова микробиоте могу допринети неуспеху антимикробне терапије, а такође отежавају испитивање утицаја дијетарних интервенција.

Дијетарним интервенцијама могуће је модификовати структуру и активност чланова микробиоте, чиме се може допринети одржавању равнотеже цревних микробних заједница, што доводи до позитивног утицаја на здравље људи. У најчешће примењиване препарате који посредством микробиоте остварују позитиван ефекат на здравље спадају пробиотици, пребиотици и симбиотици. Пробиотици се највише користе у третману и превенцији акутних поремећаја гастроинтестиналног тракта, међутим, поље њихове примене може бити знатно шире, имајући у виду нове резултате истраживања, која указују на повезаност микробиоте и имунског система, као и дисталних органа. *S. boulardii* је једини доказани пробиотик који не припада домену бактерија, а доказано је да позитивне ефекте по здравље људи испољава синтезом антимикробних једињења, разградњом токсина, и модификацијом имунског одговора домаћина.

Пребиотици представљају једињења која позитиван утицај на здравље испољавају кроз интеракције са микробиотом. Најчешће коришћени пребиотски препарати припадају групи несварљивих олигосахарида, а данас је идентификован широк спектар једињења са пребиотским потенцијалом, међу којима се убрајају полифеноли и терпеноиди, као и друга једињења заступљена у лековитом и зачинском биљу. Лековито биље представља значајан извор фитохемикалија са широким спектром биолошких активности, и од давнина се примењује у циљу превенције и третмана различитих болести. За неке од фитохемикалија лековитог биља су разјашњени механизми деловања, али за веома разноврсну групу коју чине полифеноли, механизми деловања се још увек откривају. Полифеноли представљају широко распрострањене секундарне метаболите биљака који су од недавно сврстани у групу

пребиотика. Идентификовано је преко 8000 врста полифенола, а позитивни ефекти на здравље укључују антиоксидативну, антиинфламаторну, антимикробну и антиканцерогену активност. Пребиотски потенцијал полифенола остварује се кроз две до сада идентификоване активности. Полифеноли испољавају антимикробно дејство, због чега могу изазвати одређене структурне и функционалне промене у микробиоти. Такође, полифеноли делују директно на човека, али познато је да биолошки активни метоболити који се налазе у системској циркулацији настају микробним трансформацијама ових једињења. У литератури је документована чињеница да полифеноли могу испољити антимикробну активност према патогеним микроорганизама, уз стимулативан ефекат на раст неких, најчешће пробиотских микроорганизама. Захваљујући овој особини, развој пребиотика на бази полифенола би могао допринети успостављању равнотеже микробних заједница, односно елиминацији дисбиозе. Познато је да здравствени ефекти лековитог биља у великој мери варирају између појединца. Један од разлога за ову варијабилност највероватније лежи у чињеници да расположивост и биолошка активност полифенола, као носилаца биолошких ефеката лековитог биља, зависи од метаболичке активности микробиоте сваког појединца. На основу свега наведеног, јасно је да је испитивање интеракција полифенола лековитог биља и микробиоте човека представља изузетно важно, а још увек неистражено научно поље.

За природне екстракте лековитог биља доказана је антимикробна активност усмерена ка патогеним члановима микробиоте, а такође је доказана и способност стимулације бактерија са пробиотским карактеристикама, док је у ранијим истраживањима изведеним на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију, Технолошко-металуршког факултета утврђено и да екстракти лековитог биља имају способност стимулације раста *S. boulardii*. Поред тога што је једини пробиотик који не припада бактеријама, *S. boulardii* је јединствен и по чињеници да до сада није идентификован ниједан пребиотик који стимулише његов раст, због чега је ово једини пробиотик за који није развијен симбиотик. Такође, упркос чињеници да на тржишту постоји неколико стотина пробиотских и симбиотских препарата, још увек не постоји адекватна терапија за различите патологије у којима је детектована дисбиоза микробиоте. Због тога постоји потреба за развојем нових пробиотика, пребиотика и симбиотика, а нарочито неискоришћено поље представљају препарати намењени модификацији фунгалне микробиоте тзв. микобиоте.

Циљ научног истраживања тезе представља испитивање утицаја пробиотика и пребиотика из групе полифенола на састав цревне микробиоте са посебним освртом на микобиоту. У оквиру дисертације циљ је да са допринесе разумевању интеракција фунгалних и бактеријских чланова микробиоте човека, нарочито при примени пробиотика. У практичном смислу, циљ предложене докторске дисертације је развој првог симбиотика за пробиотик *S. boulardii* чија ефикасност ће бити испитана у клиничкој студији на пацијентима оболелим од улцерозног колитиса.

У испитивањима ће бити коришћен екстракт лековите биљке хајдучке траве (лат. *Achillea millefolium*), за који је у претходним истраживањима доказана стимулативна активност на раст пробиотског квасца *S. boulardii*, као и фенолне киселине и флавоноиди присутни у овој

биљци. У оквиру предложене дисертације, биће извршено испитивање пребиотског потенцијала појединачних полифенола хајдучке траве и њихових миксева коришћењем *in vitro* тестова на појединачним микроорганизмима, кокултурама и коришћењем *in vitro* модела људског дебелог црева. Посебна пажња биће посвећена утицају одабраних једињења и миксева на раст опортунистичке патогене гљивице *C. albicans*, као најзаступљенијег представника фунгалне микробиоте. Поред појединачних полифенола испитиваће се утицај дефинисаних мешавина полифенола на раст пробиотске и патогене гљивице, са циљем идентификације група једињења која стимулишу раст пробиотика, а инхибирају раст патогене гљивице. Остварењем овог циља биће могућ развој симбиотика који комбинује пребиотик нове генерације и пробиотик *S. boulardii*. Прелиминарни резултати указују да одређени полифеноли хајдучке траве постижу значајан степена инхибиције раста *C. albicans*, уз паралелну стимулацију раста пробиотског квасца *S. boulardii*. Такође, експерименти указују на испољавање синергистичког ефекта по додатку мешавина полифенолних једињења само у одређеним концентрацијама. Према тренутно доступној литературној претрази, први пут је потврђен стимулаторни ефекат неке супстанце на раст пробиотског квасца, уз паралелну инхибиторну активност усмерену ка расту *C. albicans*. Због степена иновативности као и широке могућности примене овог открића, добијени резултати ће бити заштићени међународним патентом.

Поред *in vitro* лабораторијских испитивања, у оквиру предложене докторске дисертације биће извршено испитивање утицаја пробиотика, пребиотика и симбиотика на микробиоту и домаћина у рандомизованим, плацебо контролисаним нутритивним студијама. У циљу испитивања утицаја комбинације екстракта хајдучке траве и пробиотика *S. boulardii* на састав цревне микробиоте и здравствене ефекте биће изведена нутритивна плацебо контролисана интервентна студија, у којој ће се испитивати утицај 1) екстракта хајдучке траве 2) квасца *S. boulardii* 3) комбинације екстракта хајдучке траве и *S. boulardii* и 4) плацеба на здравствене параметре и састав цревне микробиоте пацијената оболелих од улцерозног колитиса. Циљ студије је да се утврди да ли постоји синергетско дејство екстракта хајдучке траве и пробиотског квасца, те да ли се на основу ових компонената може дефинисати први симбиотик за *S. boulardii*. Са циљем утврђивања интеракције између фунгалних и бактеријских компонената цревне микробиоте човека, биће спроведена још једна рандомизована нутритивна интервентна плацебо контролисана студија са пробиотиком који садржи пробиотски квасац у комбинацији са пробиотским бактеријама. Студија ће бити спроведена на здравим испитаницима и биће утврђене промене у саставу микробиоте испитаника.

Коначно, са циљем утврђивања интеракција између чланова гастричне микробиоте човека, биће анализирана заступљеност гљивица из рода *Candida* у желуцу пацијената са потврђеном инфекцијом *Helicobacter pylori* бактеријом. Испитивањем гастричних биоптата и детекцијом чланова микробиоте, анализираће се ендосимбиотска веза између квасца *C. albicans* и бактерије *H. pylori* која је показана у *in vitro* испитивањима. Како у реалним условима присуство *Candida* гљивица у гастричној микробиоти може допринети и резистенцији *H. pylori* на антибиотски третман, у оквиру докторске дисертације биће анализирана преваленца присуства гљивица у гастричној микробиоти пацијената са *H.*

pylori инфекцијом. Статистичком анализом добијених података биће утврђено да ли је присуство гљивица у гастричној микробиоти у корелацији са перзистентном *H. pylori* инфекцијом упркос вишеструком антибиотском третману.

Литература

1. Applequist, W.L. and D.E. Moerman, *Yarrow (Achillea millefolium L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research*. Economic Botany, 2011. **65**(2): p. 209.
2. Bačić, A. and M. Rajilić-Stojanović, *2.01 - Microbiota Changes Throughout Life - An Overview*, in *Comprehensive Gut Microbiota*, M. Glibetic, Editor. 2022, Elsevier: Oxford. p. 1-12.
3. Blumberg, R. and F. Powrie, *Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey*. Science translational medicine, 2012. **4**(137): p. 137rv7-137rv7.
4. Chin VK, Yong VC, Chong PP, Amin Nordin S, Basir R, Abdullah M. *Mycobiome in the Gut: A Multiperspective Review*. Mediators Inflamm. 2020. 9560684. doi: 10.1155/2020/9560684.
5. Costa, M. and J.S. Weese, *Methods and basic concepts for microbiota assessment*. Vet J, 2019. **249**: p. 10-15.
6. Dey, P., *Gut microbiota in phytopharmacology: A comprehensive overview of concepts, reciprocal interactions, biotransformations and mode of actions*. Pharmacological Research, 2019. 147: p. 104367.
7. Hong, G., et al., *Gut fungal dysbiosis and altered bacterial-fungal interaction in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: An explorative study*. Neurogastroenterology & Motility, 2020. **32**(11): p. e13891.
8. Kaźmierczak-Siedlecka, K., et al., *Saccharomyces boulardii CNCM I-745: A Non-bacterial Microorganism Used as Probiotic Agent in Supporting Treatment of Selected Diseases*. Current Microbiology, 2020. **77**(9): p. 1987-1996.
9. Koudoufio, M., et al., *Insight into Polyphenol and Gut Microbiota Crosstalk: Are Their Metabolites the Key to Understand Protective Effects against Metabolic Disorders?* Antioxidants, 2020. **9**(10): p. 982.
10. Kumar Singh, A., et al., *Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency*. Nutrients, 2019. **11**(9): p. 2216.
11. Laforest-Lapointe, I. and M.-C. Arrieta, *Microbial Eukaryotes: a Missing Link in Gut Microbiome Studies*. mSystems, 2018. **3**(2): p. e00201-17.
12. Milutinović, M., et al., *Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste Achillea millefolium dust*. Industrial Crops and Products, 2015. **77**: p. 333-341.
13. Milutinović, M., S. Dimitrijević-Branković, and M. Rajilić-Stojanović, *Plant Extracts Rich in Polyphenols as Potent Modulators in the Growth of Probiotic and Pathogenic Intestinal Microorganisms*. Front Nutr, 2021. **8**: p. 688843.
14. Pais, P., et al., *Saccharomyces boulardii: What Makes It Tick as Successful Probiotic?* Journal of Fungi, 2020. **6**(2): p. 78.
15. Pascale, A., et al., *Microbiota and metabolic diseases*. Endocrine, 2018. **61**(3): p. 357-371.
16. Pérez, J.C., *Fungi of the human gut microbiota: Roles and significance*. International Journal of Medical Microbiology, 2021. **311**(3): p. 151490

17. Plamada, D. and D.C. Vodnar, *Polyphenols; Gut Microbiota Interrelationship: A Transition to a New Generation of Prebiotics*. Nutrients, 2022. **14**(1): p. 137.
18. Pollock, J., et al., *The madness of microbiome: attempting to find consensus "best practice" for 16S microbiome studies*. Applied and environmental microbiology, 2018. **84**(7): p. e02627-17.
19. Rajilić-Stojanović, M. and W.M. de Vos, *The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota*. FEMS Microbiol Rev, 2014. **38**(5): p. 996-1047.
20. Rajilić-Stojanovic, M., Maathuis, A., Heilig, H. G., Venema, K., de Vos, W. M., & Smidt, H., *Evaluating the microbial diversity of an in vitro model of the human large intestine by phylogenetic microarray analysis*. Microbiology, 2010. 156(11), 3270-3281.
21. Santhiravel, S., et al., *The Impact of Plant Phytochemicals on the Gut Microbiota of Humans for a Balanced Life*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(15).
22. Vitalini, S., et al., *Phenolic compounds from Achillea millefolium L. and their bioactivity*. Acta biochimica Polonica, 2011. **58**: p. 203-9.
23. Zhang J et al. *Development of Candida-specific real-time PCR assays for the detection and identification of eight medically important Candida species*. Microbiological Insights, 2016. **9**:21-8.

3. Полазне хипотезе

Узимајући у обзир наведене теоријске податке, дефинисане су следеће научне хипотезе које ће бити тестиране у оквиру докторске дисертације:

Прва хипотеза ове докторске дисертације је да се полифенолна једињења присутна у хајдучкој трави могу користити за развој првог симбиотика на бази пробиотске гљивице *S. boulardii*. Хипотеза ће бити тестирана испитивањем ефикасности симбиотског препарата који се састоји од комбинације пробиотског квасца *S. boulardii*, екстракта хајдучке траве и дефинисаних полифенола. Хипотеза ће бити тестирана у *in vitro* лабораторијским испитивањима, као и у нутритивној плацебо контролисаној интервентној клиничкој студији са пацијентима оболелим од улцерозног колитиса.

Друга хипотеза ове докторске дисертације је да се применом пребиотика из групе полифенола и/или симбиотика који укључује полифеноле биљака и пробиотску гљивицу *S. boulardii* може утицати на структуру микробиоте кроз значајне и повољне модификације у саставу гљивичне и бактеријске компоненте цревне микробиоте.

И коначно, трећа хипотеза ове дисертације је да чланови фунгалне и бактеријске микробиоте ступањем у међусобне интеракције могу утицати на резултат антимикробног третмана, међу којима се издваја могућност успостављања ендосимбиотских веза између бактерија и квасаца. Тестирање хипотезе биће извршено утврђивањем интеракција између чланова гастричне микробиоте човека, и у оквиру испитивања биће анализирана заступљеност гљивица из рода *Candida* у желуцу пацијената са потврђеном инфекцијом *Helicobacter pylori* бактеријом. Статистичком анализом добијених података биће утврђено да ли је присуство гљивица у гастричној микробиоти у корелацији са перзистентном *H. pylori* инфекцијом и вишеструком неуспеху антибиотских третмана.

4. Научне методе истраживања

Испитивање утицаја полифенола и екстракта хајдучке траве на раст микроорганизама биће извршено праћењем ефеката додавања екстракта, појединачних полифенолних једињења и мешавине полифенола у микробиолошку подлогу за раст у дефинисаном опсегу концентрација, који одговара реалном дневном уносу ове групе једињења. Утицај на раст гљивица биће праћен у појединачној или мешаној култури, коришћењем микродилуционе методе уз бројање израслих колонија на чврстој микробиолошкој подлози. За испитивање раста у мешаним културама квасаца биће коришћена комерцијално доступан *HiCrome*TM *Candida* диференцијални агар. Резултати ће бити изражени као степен стимулације или степен инхибиције раста у односу на раст микроорганизама у контролној подлози без додатка полифенола, као и израчунавањем скорa пребиотске активности.

Полифенолна једињења која ће бити коришћена су одабрана на основу два критеријума. Први критеријум је да су компоненте екстракта хајдучке траве репортиране у литератури као значајни носиоци биолошке активности ове биљке. Такође, у испитивање ће бити укључена једињења чија концентрација у екстракту се смањује услед раста *S. boulardii*, а која су идентификована коришћењем течне хроматографије високих перформанси уз коришћење полифенолних једињења као стандарда. Поред испитивања утицаја на модел систем фунгалне микробиоте, ефекат уноса мешавине полифенола, као и екстракта хајдучке траве испитиваће се и коришћењем TIM-2 *in vitro* модела дебелог црева у коме ће се анализирати целокупна цревна микробиота и микробни метаболити. Планирано је да се у TIM-2 *in vitro* модел унесе 0,5-1,5 g укупних полифенола било из екстракта хајдучке траве или из микса одабраних полифенолних једињења. Ова количина одговара препорученом дневном уносу полифенола. Анализа циљаних микробних метаболита биће извршена одговарајућим аналитичким методама укључујући гасну хроматографију и течну хроматографију високих перформанси уз одговарајуће стандарде. Анализа целокупне микробиоте биће извршена биоинформатичком обрадом секвенци које кодирају 16S рРНК ген за бактерије, односно *ITS-2* за гљивице а које су добијене анализом узорака ДНК изолованих из одговарајућих узорака TIM-2 *in vitro* модела. Такође, биће извршена прецизна квантификација гљивица из родова *Candida* и *Saccharomyces* применом *RT-PCR* методе.

Поред *in vitro* испитивања у оквиру предложене докторске дисертације планирано је извођење рандомизованих, двоструко слепих, плацебо контролисаних нутритивних студија, у којима ће утицај дијететских интервенција бити испитиван анализом здравствених параметара испитаника, као и анализом промена у структури њихове цревне микробиоте. Испитаће се утицај пробиотског квасца *S. boulardii*, као и пребиотски потенцијал екстракта хајдучке траве, а такође анализараће се и интеракције између фунгалних и бактеријских чланова микробиоте човека. Анализа састава микробних заједница у нутритивним студијама, биће утврђена коришћењем метода базираних на секвенци гена који кодирају 16S рибозомалну РНК бактерија и *ITS-2* региона који раздваја секвенце 5.8S и 28S кодирајућих гена гљивица. Секвенцирање ће бити спроведено на *Illumina* платформи, а биоинформатичком анализом добијених секвенци биће омогућена идентификација и квантификација бактеријске и фунгалне микробиоте. Поређењем са микробиотом контролног узорка, мултиваријантном статистичком анализом биће омогућена анализа утицаја микса полифенола хајдучке траве, екстракта хајдучке траве, као и испитивање

утицаја пробиотика *S. boulardii* и њихове мешавине на микробиоту човека у односу на плацебо. Коришћењем *RT-PCR* методе биће извршена анализа преваленце присуства гљивица у клиничким узорцима, уз коришћење прајмера који омогућавају детекцију и идентификацију појединачних врста из *Candida* рода. Статистичком анализом добијених података биће испитивано постојање корелације између присуства гљивица у гастричној микробиоти и перзистентне *H. pylori* инфекције, резистентне на вишеструке антибиотске третмане. Анализом узорака столице биће анализирано потенцијална повезаност присуства гљивица и рода *Candida* и бактеријских компонената микробиоте као и здравственог стања испитаника.

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће из истраживања проистећи резултати са вишеструким значајним научним доприносом, међу којима се могу издвојити следећа:

- установиће се утицај екстракта хајдучке траве и полифенолних једињења на састав и активност микробних заједница у TIM-2 *in vitro* моделу дебелог црева у циљу евалуације могућности примене оваквих препарата у циљу елиминисања дисбиозе микробиоте и микобиоте.
- испитаће се структура микробних заједница у здравој популацији и одређеним патологијама гастроинтестиналног тракта, и испитаће се могућност модификације микробиоте дијететским интервенцијама препаратима који садрже пробиотике и пребиотике из групе полифенола.
- испитаће се постојање интеракција између чланова фунгалне и бактеријске микробиоте цревној микробиоти, али и у мање испитаним деловима гастроинтестиналног тракта, попут гастричне микробиоте.
- дефинисаће се састав пребиотског препарата на бази мешавине полифенола, појединачних фенолних киселина и флавоноида, изолованих из екстракта хајдучке траве, усмереног ка стимулацији раста пробиотског квасца *S. boulardii* на основу чега ће бити развијен први симбиотик на бази пробиотског квасца *S. boulardii*.

6. План истраживања и структура рада

У току истраживања биће урађено следеће:

- Извршиће се идентификација фенолних и полифенолних компонената хајдучке траве са најпотентнијим стимулаторним ефектом усмереним ка расту *S. boulardii*, уз паралелну инхибицију *C. albicans*
- Коришћењем TIM-2 *in vitro* модела дебелог црева биће извршено испитивање утицаја полифенолних једињења и екстракта хајдучке траве на цревну микробиоту

- У нутритивним клиничким студијама вршиће се даље испитивање пребиотског потенцијала полифенола, екстракта хајдучке траве и анализирати састав и активност цревне микробиоте
- Интеракције између фунгалних и бактеријских чланова ће бити анализирани у узорцима гастриинтестиналног тракта
- Структура микробних заједница биће анализирана коришћењем метода секвенцирања, и биоинформатичком обрадом секвенци као и статистичком обрадом добијених података.
- Утврдиће се постојање корелације између примењених дијететских интервенција и промена у структури микробиоте повезане са позитивним ефектима по здравље људи.

Очекује се да ће докторска дисертација имати следећа поглавља: *Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак, Литература*. У поглављу *Увод* биће дефинисани главни циљеви дисертације, предмет истраживања и допринос дисертације. У оквиру *Теоријског дела* докторске дисертације детаљним прегледом литературе биће утврђена досадашња истраживања структуре и функције цревне микробиоте, са посебним освртом на чланове фунгалних заједница. Такође ће бити дат приказ примењиваних дијететских интервенција у виду пробиотика, лековитог биља, као и полифенолних једињења. У оквиру *Теоријског дела* ће бити наведене и методе којима је данас могуће извршити анализу микробних заједница, као и биоинформатички протоколи који се користе у даљој обради података.

У оквиру *Експерименталног дела*, биће дат приказ коришћеног материјала и метода које ће се користити током испитивања пребиотског потенцијала лековитог биља, полифенолних једињења и пробиотског потенцијала *S. boulardii*. Биће приказане коришћене култивационе методе и протоколи припреме подлога за раст, као и методе испитивања стимулације раста микроорганизама. Такође, биће приказани и поступци анализе цревне микробиоте у *in vitro* моделу гастроинтестиналног система, као и у клиничким студијама. У поглављу *Резултати и дискусија*, биће приказани и дискутовани експериментални резултати добијени применом различитих пребиотских и пробиотских препарата у *in vitro* испитивањима и клиничким студијама са људима, док ће у поглављу *Закључак* бити сумирани сви добијени резултати на основу изведених истраживања. У поглављу *Литература* ће се налазити сви цитирани наводи, као и радови који су настали у току истраживања и рада на овој докторској дисертацији.

7. Закључак и предлог

На основу изложених података о досадашњем раду и постигнутим резултатима, комисија сматра да кандидаткиња Ана Бачић, мастер инжењер технологије, испуњава све потребне услове за рад на предложеној теми докторске дисертације. Такође на основу изнетих података, комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације под насловом: „Утицај дијететских суплемената на бази пробиотика и полифенола на састав микробиоте човека“ научно утемељена, као и да ће представљати значајан допринос у ужој научној области Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидаткињи Ани Бачић одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом. За ментора докторске дисертације комисија предлаже др Мирјану Рајилић-Стојановић, ванредног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду,
09.06.2023. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Дејан Безбрадица, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Маја Толиначки, виши научни сарадник
Универзитета у Београду, Институт за молекуларну генетику
и генетичко инжењерство

.....
Др Милица Милутиновић, научни сарадник
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

