

Биолошки факултет
Број захтева:50/128-1
Датум: 14. 6. 2024.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

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

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Карактеризација анаеробних бактерија, произвођача γ -аминобутерне киселине, и њихова улога у превенцији и третману депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова”

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биолошке науке.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Христина Д. Митровић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):
Универзитет у Београду – Биолошки факултет.
3. Година дипломирања: 2020.
4. Година уписа на докторске студије: 2021/2022.
Универзитет у Београду - Биолошки факултет
5. Назив студијског програма докторских студија: Биологија, модул: Генетика.
6. Датум подношења пријаве теме докторске дисертације: 1. 4. 2024.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

A:

Име и презиме ментора: **др Светлана Соковић Бајић**,

Звање: научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Бајић, SS.**, Đokić, J., Dinić, M., Tomić, S., Popović, N., Brdarić, E., Golić, N., Tolinački, M. GABA potentiate the immunoregulatory effects of *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 via ATG5-dependent autophagy *in vitro*. *Sci Rep*. 2020 Jan 28;10(1):1347. doi: 10.1038/s41598-020-58177-2. PMID: 31992761; PMCID: PMC6987229.
2. **Sokovic Bajic, S.**, Djokic, J., Dini,c M., Veljovic, K., Golic, N., Mihajlovic, S., Tolinacki, M. GABA-Producing Natural Dairy Isolate From Artisanal Zlatar Cheese Attenuates Gut Inflammation and Strengthens Gut Epithelial Barrier *in vitro*. *Front Microbiol*. 2019 Mar 18;10:527. doi: 10.3389/fmicb.2019.00527. PMID: 30936860; PMCID: PMC6431637.
3. **Bajic, SS.**, Cañas, MA., Tolinacki, M., Badia, J., Sánchez, B., Golic, N., Margolles, A., Baldomá, L., Ruas-Madiedo, P. Proteomic profile of extracellular vesicles released by *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8 and their internalization by non-polarized HT29 cell line. *Sci Rep*. 2020 Dec 11;10(1):21829. doi: 10.1038/s41598-020-78920-z. PMID: 33311536; PMCID: PMC7732981.
4. Brdarić, E., Popović, D., **Soković Bajić, S.**, Tucović, D., Mutić, J., Čakić-Milošević, M., Đurđić, S., Tolinački, M., Aleksandrov, AP., Golić, N., Mirkov, I., Živković, M. Orally Administrated *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8-Derived EPS-AN8 Ameliorates Cd Hazards in Rats. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 2;24(3):2845. doi: 10.3390/ijms24032845. PMID: 36769176; PMCID: PMC9917968.
5. Popovic, D., Kulas, J., Tucovic, D., Popov Aleksandrov, A., Malesevic, A., Glamoclija, J., Brdaric, E., **Sokovic Bajic, S.**, Golic, N., Mirkov, I., Tolinacki, M. Gut microbial dysbiosis occurring during pulmonary fungal infection in rats is linked to inflammation and depends on healthy microbiota composition. *Microbiol Spectr*. 2023 Aug 25;11(5):e0199023. doi: 10.1128/spectrum.01990-23. Epub ahead of print. PMID: 37623316; PMCID: PMC10581041.

Б:

Име и презиме ментора: **др Јелена Трајковић,**

Звање: доцент, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Trajković, J.**, Pavković-Lučić, S., Miličić, D., Savić, T. Different diets can affect attractiveness of *Drosophila melanogaster* males via changes in wing morphology. *Anim Behav.* 2021; 171: 51-62. doi:10.1016/j.anbehav.2020.11.005.
2. **Trajković, J.**, Pavković-Lučić, S., Savić, T. Mating success and wing morphometry in *Drosophila melanogaster* after long-term rearing on different diets. *Behaviour* 2013; 150: 1431–1448. doi:10.1163/1568539X-00003103.
3. **Trajković, J.**, Miličić, D., Savić, T., Pavković-Lučić, S. Sexual selection, sexual isolation and pheromones in *Drosophila melanogaster* strains after long-term maintaining on different diets. *Behav Proc.* 2017; 140: 81–86. doi:10.1016/j.beproc.2017.04.006.
4. **Trajković, J.**, Makevic, V., Pesic, M., Pavković-Lučić, S., Milojevic, S., Cvjetkovic, S., Hagerman, R., Budimirovic, DB., Protic, D. *Drosophila melanogaster* as a Model to Study Fragile X-Associated Disorders. *Genes* 2023; 14(1): 87. doi:10.3390/genes14010087.
5. Pavković-Lučić, S., **Trajković, J.**, Miličić, D., Anđelković, B., Lučić, L., Savić, T., Vujisić, Lj. “Scent of a fruit fly”: Cuticular chemoprofiles after mating in differently fed *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) strains. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2022; e21866. doi:10.1002/arch.21866

Обавештамо вас да је Наставно-научно веће Универзитета у Београду-Биолошког факултета, на седници одржаној 14. 6. 2024. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.
3. Електронска верзија
4. Потврда Етичке комисије



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

50/128 - 14. 6. 2024.

На основу члана 96. Закона о високом образовању, члана 62. став 1. тачка 12. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета и члана 29. Правилника о докторским студијама на Универзитету у Београду-Биолошком факултету, бр: 15/276 од 07.09.2018; 15/122 од 14.06.2019.; 15/132 од 11.09.2020. године., Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 14. 6. 2024. године, донело је

О Д Л У К У

о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора

На основу Извештаја Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације прихвата се тема докторске дисертације и одређује ментор кандидату:

Христини Д. Митровић, мастер биолог, студијског програма докторских студија: Биологија, модул: Генетика, под називом:

„Карактеризација анаеробних бактерија, произвођача γ -аминобутерне киселине, и њихова улога у превенцији и третману депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова”

За менторе се одређују:

1. др Светлана Соковић Бајић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
2. др Јелена Трајковић, доцент, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Љубиша Станисављевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 12. 4. 2024. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације **Христине Д. Митровић**, под насловом: „**Карактеризација анаеробних бактерија, произвођача γ -аминобутерне киселине, и њихова улога у превенцији и третману депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова**”.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад **Христине Д. Митровић**, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографија:

Општи подаци:

Име, средње слово и презиме: Христина Д. Митровић

Датум и место рођења: 2. 8. 1997., Ниш

Образовање:

2021 – тренутно Докторске академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Студијски програм: Биологија, Модул: Генетика

2020 – 2021. Мастер академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Студијски програм: Биологија, Модул: Примењена генетика

2016 – 2020. Основне академске студије, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Модул: Биологија

Запослење:

2023 – тренутно Истраживач приправник, Група за интеракције пробиотика и микробиоте са домоћином, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду

2022 – 2023. Истраживач приправник, Група за молекуларну биологију, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду

Курсеви: /

Пројекти: /

Чланство у научним друштвима:

Српско друштво за молекуларну биологију

Друштво генетичара Србије

Удружење микробиолога Србије

Страни језици:

енглески

Посебне активности и награде: /

Б) Библиографија:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Veljovic, K., Tesevic, V., **Mitrovic, H.**, Stankovic, M. Essential oil of *Origanum minutiflorum* exhibits anti-inflammatory and antioxidative effects in human bronchial cells and antimicrobial activity on lung pathogens. *J. Herb. Med.* **2023**. Vol 39, <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100651>

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

/

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у целости

/

Б4. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу

1. Veljović, K., **Mitrović, H.**, Golić, N., Stanković, M. Probiotics decrease LPS induced inflammatory response in human bronchial cells – a potential therapeutics in chronic inflammatory lung diseases. 11th probiotics, prebiotics & new foods, nutraceuticals and botanicals for nutrition & human and microbiota health; 2 nd science & business symposium. Септембар 12-14. **2021**, Рим, Италија. У књизи апстраката, pp 72.
2. **Mitrović, H.**, Soković Bajić, S., Veljović, K., Golić, N., Stanković, M. Interspecies interaction of *Lactiplantibacillus plantarum* BGPKM22 strain and primary human bronchial epithelial cells stimulates the synthesis of exopolysaccharide layer. 12th probiotics, prebiotics & new foods, nutraceuticals and botanicals for nutrition & human and microbiota health; 3rd science & business symposium. Септембар 16-20.**2023**, Рим, Италија. У књизи апстраката, pp 105.
3. Soković Bajić, S., Kosanović, L., **Mitrović, H.**, Brdarić, E., Dinić, M., Jakovljević, S., Stevanović, D., Rúas Madiedo, P., Tolinački, M., Golić, N. Effect of paraprobiotic *L. plantarum* BGAN8 on mitochondrial function in HT-29 cells. 12th probiotics, prebiotics & new foods, nutraceuticals and botanicals for nutrition & human and microbiota health; 3rd science & business symposium. Септембар 16-20. **2023**, Рим, Италија. У књизи апстраката, pp 105.
4. **Mitrovic, H.**, Brdaric, E., Bisenic, A., Jakovljevic, S., Dinic, M., Djokic, J., Terzic-Vidojevic, A., Tolinacki, M., Golic, N., Sokovic Bajic, S. From gut to lab: unlocking anti-inflammatory potential with GABA - producing bacteria. From biotechnology to

human and planetary health. Mikromed regio 5. Април 4-6. 2024. Београд, Србија. У књизи апстраката, pp 111. Усмена презентација.

Б5. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

/

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

„Карактеризација анаеробних бактерија, произвођача γ -аминобутерне киселине, и њихова улога у превенцији и третману депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова”.

Полазне основе:

Депресија је најчешће психијатријско обољење од ког болује око 280 милиона људи широм света, према истраживању Светске здравствене организације из 2023. године. Употреба антидепресива се суочава са великим изазовима попут ниске ефикасности, високе стопе релапса, одложеног клиничког одговора и бројних нежељених ефеката [1]. Постбиотици, биоактивне компоненте продуковане од стране психобиотика, пробиотика који имају благотворни ефекат на ментално здравље, показали су обећавајуће резултате у ублажавању поремећаја расположења. Модеран начин живота и исхрана често доводе до дисбаланса у микробиоти црева, што повећава склоност ка хроничној инфламацији. Овај дисбаланс резултује повећаном пропустљивости цревне и крвно-мождане баријере, отварајући пут проинфламаторним факторима, што је један од потенцијалних узрочника депресије.

Гастроинтестинални систем човека садржи између 10^{13} и 10^{14} микроорганизама, што је чак 10 пута више од укупног броја ћелија човека [2]. Кроз коеволуцију, микробиота је учествовала у обликовању имунског система код човека, као и у развоју функција мозга, па тако има и ефекат на понашање, регулацију апетита, метаболизам неуротрансмитера и хормона [3]. Комуникација између мозга и цревне микробиоте је двосмерна, па тако и централни нервни систем утиче на састав и активност микробиоте. Комуникација се одвија посредством имунског система, неуроендокриног система, као и директно преко нервних ћелија [4].

ГАМА-аминобутерна киселина (ГАБА, од енглеског: γ -aminobutyric acid) је главни инхибиторни неуротрансмитер у централном нервном систему који има важну улогу у патофизиологији депресије и анксиозности. Такође, ГАБА учествује у регулацији крвног притиска, откуцаја срца и перцепцији бола, укључена је у контролу лучења хормона раста, заштиту од акутног оштећења бубрега и има анти-пролиферативну активност [5].

Психобиотици означавају бактеријске сојеве који утичу на функцију централног нервног система. Ови микроорганизми производе различите супстанце, укључујући ГАБА, као неуроактивне молекуле које модулишу нервне сигнале, утичући на неуролошке и психијатријске параметре, као и на сан, апетит, расположење и когницију [6]. ГАБА произведена од стране микробиоте може проћи кроз цревну баријеру путем H^+ / ГАБА симпортера и везати се за рецепторе који су широко распрострањени на ентеричним неуронима и нерву вагусу и на тај начин директно утицати на нервни систем [5]. Код бактерија је ензим глутамат декарбоксилаза кодиран *gadB* геном, а секреција се врши антипортером кодираним *gadC* геном. Секреција ГАБА представља механизам отпорности бактерија на киселе услове средине. Декарбоксилација глутамата се индукује при ниском рН. Ензим глутамат декарбоксилаза везује молекулу глутамата и катализује уклањање карбоксилне групе. Овај процес резултира синтезом молекула ГАБА уз утрощак једног протона и ослобађање једног молекула CO_2 [7].

Познато је да бактерије, као што су *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, могу синтетисати ГАБА из глутамата пореклом из хране. Показано је да *Lactobacillus rhamnosus* смањује анксиозност и депресивно понашање док повећава ниво ГАБА у хипокампусу [8]. Велики потенцијал лежи у, до сада слабо истраженим, анаеробним микроорганизмима који насељавају цревни систем, означеним као пробиотици будуће генерације. Пробиотици будуће генерације представљају нове пробиотичке микроорганизме који имају потенцијал да буду ефикаснији и циљано усмерени ка решавању различитих здравствених проблема, што их чини изузетно важним за будућност медицине.

Проширивање истраживања у смеру разумевању веза између анаеробних бактерија, производње ГАБА, цревне микробиоте и менталног здравља, допринеће унапређењу тренутних терапеутских приступа и квалитета живота.

Предмет докторске дисертације

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације је утицај анаеробних бактерија које продукују ГАБА на симптоме депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова.

Научни циљ истраживања

Општи циљ:

Утврђивање улоге и молекуларних механизма који су у основи интеракције анаеробних микроорганизма који продукују ГАБА са домаћином. Посебно ће бити окарактерисан ефекат постбиотика, који се састоји од неживих анаеробних бактерија, продуковане ГАБА

и других метаболита, на симптоме депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова.

Специфични циљеви:

1. Изоловање и култивација анаеробних бактерија које продукују ГАБА.
2. Испитивање утицаја постбиотика, који садрже ГАБА, на стање инфламације *in vitro*, као и утицај на експресију неуропептида и неуротрансмитера *in vivo* на моделу *Caenorhabditis elegans*.
3. Испитивање ефекта постбиотика, који садрже ГАБА, *in vivo* на симптоме депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова, на нивоу понашања, метагенома, метаболома, транскриптома и/или епигенома.

Материјал и методе који се користе

Изоловање и култивација анаеробних бактерија:

У овом истраживању, за изоловање анаеробних бактерија биће коришћен фекални материјал здравих донора (до 20 донора, по етичкој дозволи број: О-ЕО-019/2020). Коришћењем различитих чврстих медијума, у анаеробној комори на температури од 36°C, анаеробне бактерије ће бити изоловане у року од највише 1 сат након узорковања фекалног материјала. Након 24 сата инкубације, на основу морфолошког изгледа колонија, појединачне колоније ће бити одвојене ради добијања чистих култура. Прављењем микроскопских препарата, одабране бактерије ће бити морфолошки окарактерисане. Након тога, биће инокулисане у течни медијум, који садржи глутамат, у којем ће расти током 48 сати.

Идентификација бактеријских врста:

Након раста бактеријских култура у течном медијуму биће изолована укупна ДНК из бактерија. Након изоловања ДНК, идентификација чистих култура биће урађена секвенцирањем гена за рибозомалну 16С рРНК.

Одређивање присутности и количине синтетисане ГАБА:

Способност продукције ГАБА код изолованих анаеробних бактерија биће тестирана танкослојном хроматографијом- TLC (од енглеског: Thin Layer Chromatography).

Супернатанти култура бактерија, које на TLC методи дају позитиван резултат, биће подвргнути квантификацији ГАБА течном хроматографијом високих перформанси- HPLC (од енглеског: High-Performance Liquid Chromatography).

Испитивање утицаја постбиотика *in vitro*:

У *in vitro* испитивањима биће коришћена Сасо2 ћелијска линија (Европска колекција ћелијских култура, ЕСАСС, br. 86010202) и Сасо2 ћелијска линија у комбинацији са периферним мононуклеарним ћелијама крви. Ћелијама ће бити изазвана инфламација

коришћењем проинфламаторних цитокина, а затим, након коинкубације са постбиотицима, биће измерена цитотоксичност третмана коришћењем LDH теста (од енглеског: Lactate dehydrogenase assay).

Поред тога, биће испитиван утицај постбиотика, не само на смањење инфламације која је претходно изазвана у ћелијама, већ и на очување интегритета ћелијског монослоја мерењем трансепителног електричног отпора TEER методом (од енглеског: transepithelial/transendothelial electrical resistance). Коришћењем ланчане реакције полимеризације у реалном времену- Real-Time PCR (од енглеског: Real-Time Polymerase Chain Reaction), Western blot методом и ELISA тестом (од енглеског: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) биће анализирана промена експресије гена од интереса и продукција проинфламаторних и имунорегулаторних цитокина у интеракцији ћелија са постбиотицима.

Испитивање утицаја постбиотика *in vivo*:

Caenorhabditis elegans је често коришћен модел систем за изучавање интеракција између микробиоте и домаћина, као и за праћење промена понашања. У овом истраживању модел систем *C. elegans* ће бити коришћен за испитивање утицаја постбиотика на експресију неуропептида и неуротрансмитера користећи Real-Time PCR и Western blot методе. Додатно, поред дивљег соја *C. elegans*, у истраживањима ће бити коришћен и „knoc-out“ сој за *unc-49* ген (e382), који кодира ГАБА рецептор.

Два постбиотика, одабрана на основу остварених резултата у претходно поменутих истраживањима, биће анализирана и секвенцирањем целокупног генома. Терапеутски потенцијал одабраних постбиотика ће бити испитан *in vivo* на пацовима излаганим хроничном непредвидивом благу стресу, најчешће коришћеном животињском моделу депресије. Експерименти ће бити реализовани на Институту за нуклеарне науке „Винча“, према етичкој дозволи број: 323-07-08974/2020-05 и уверењу број: 24-DMSO-007707.

Мужјаци Wistar пацова стари три недеље биће подељени на четири групе: (1) контролни, нетретирани пацови; (2) пацови третирани медијумом за раст бактерија; (3) пацови третирани постбиотиком 1 и (4) пацови третирани постбиотиком 2 у трајању од 8 недеља. После 4 недеље третмана, половина пацова из сваке групе ће бити излагана хроничном непредвидивом благом стресу наредне 4 недеље. Животиње ће бити подвргнуте тестовима понашања на почетку експеримента, пре почетка деловања стресора и на крају експеримента, након чега ће бити жртвоване. Тест заинтересованости за заслађен раствор и тест прскања (од енглеског: splash test) биће коришћени за мерење анхедоније, главног симптома депресије, а тест закопавања кликера и издигнутог лавиринта за процену анксиозности. У наставку истраживања биће анализирана ткива, крвни серум и цереброспинална течност животиња третираних постбиотиком који је остварио бољи ефекат на нивоу понашања.

Анализа ткива, крвног серума и цереброспиналне течности пацова након третмана постбиотиком:

У серуму пацова биће мерене концентрације проинфламаторних цитокина коришћењем ELISA методе, као и метаболита триптофан-кинуреинског пута, ГАБА и серотонина

коришћењем методе UPLC-MS/MS (од енглеског: Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry). Концентрације ГАБА и серотонина биће мерене и у цереброспиналној течности контролних и третираних животиња.

Ткиво илеума ће бити коришћено за тестирање пропустљивости црева праћењем морфологије на пресецима обојеним хематоксилином/еозином и експресије протеина чврстих веза (зонулин, оклудин и клаудин) имунохистохемијом и Western blot методом. У илеуму ће бити анализирана и експресија проинфламаторних цитокина Real-Time PCR методом, да би било испитано да ли постбиотици могу да одрже интегритет цревне епителне баријере и спрече појаву инфламације код пацова подвргаваних стресу.

Из хипокампуса, можданог региона који има веома важну улогу у патофизиологији депресије, биће изолована целокупна РНК ради анализе транскриптома. На овај начин ће бити утврђено код којих гена долази до промене у експресији у моделу депресије и да ли примена постбиотика може спречити или смањити уочене промене.

Узорци фецеса пацова, прикупљени пре почетка излагања стресорима и на крају експеримента, ће бити искоришћени за анализу микробиоте црева shotgun секвенцирањем метагенома. Биће анализирани разлике у диверзитету микробиоте између контролних и третираних група пацова. Такође, биће анализиран метаболом у фецесу, коришћењем UPLC-MS/MS методе, како би било утврђено да ли третман постбиотиком може спречити нарушавање равнотеже микробиоте црева изазвано стресом, односно ублажити функционалне промене микробиоте црева.

Биоинформатичка и статистичка анализа података:

За анализу секвенци целих генома бактерија ће бити коришћени FastQC, SPAdes, Kraken i Prokka. Обрада података добијених shotgun секвенцирањем биће урађена коришћењем алата FastQC, KneadData, Kraken, Braken и HUMAnN алата, уз помоћ R скрипата. За статистичку обраду података биће коришћен GraphPad Prism.

Анализа промена на епигенетичком нивоу:

Након анализе ефеката на нивоу глобалне експресије гена, биће испитан и епигенетички утицај постбиотика на проинфламаторне цитокине, као и гене од интереса чија је експресија промењена под утицајем третмана. Такође, биће анализиран утицај третмана на метилацију ДНК и модификације хистона, као два важна процеса у контроли експресије гена.

Очекивани резултати и научни допринос

Изолација ГАБА продукујућих анаеробних бактерија и квантификација продуковане ГАБА су први очекивани резултати овог истраживања. У циљу испитивања утицаја постбиотика, који садрже ГАБА, на интегритет епителне баријере црева *in vitro*, биће коришћена два приступа. Први подразумева употребу Са_со₂ ћелија у којима је индукована инфламација проинфламаторним цитокинима за одабир постбиотика који умањују индуковану експресију гена за интерлеукин-8 (IL-8). У другом приступу, биће

комбиноване CaSO_2 ћелије са периферним мононуклеарним ћелијама крви (PBMC, од енглеског: peripheral blood mononuclear cells), такође третиране проинфламаторним цитокинима, с циљем одабира постбиотика који, не само смањују производњу проинфламаторних цитокина и подижу ниво имунорегулаторних цитокина, већ и обнављају експресију протеина одговорних за чврсте међућелијске везе које су нарушене због инфламације. Следећи резултат биће ефекат постбиотика, који садрже ГАБА, на експресију неуротрансмitera и неуропептида, повезаних са депресијом, на моделу *C. elegans*. На основу тога који постбиотици буду остваривали најповољнији ефекат на повећање експресије неуротрансмitera и неуропептида, биће одабрана два кандидата чији ће ефекат бити тестиран на животињском моделу депресије, пацовима подвргнутим хроничном непредвидивом благом стресу. Очекивано је да постбиотици ублаже симптоме понашања налик депресији код пацова излаганих хроничном стресу. Узорци ткива и крвног серума пацова третираних постбиотиком који покаже боље ефекте на нивоу понашања биће подвргнути детаљним молекуларним и биохемијским анализама. Очекивано је да постбиотик доведе до смањења концентрације проинфламаторних цитокина у серуму пацова, као и пораста нивоа ГАБА и серотонина, што би потврдило повољан ефекат постбиотика. Такође, очекивано је да третман постбиотиком спречи или смањи стресом изазвано нарушавање цревне баријере анализирано на пресецима илеума. Након изолације целокупне РНК и анализе транскриптома хипокампуса биће добијена листа диференцијално експримираних гена и путева који се разликују у третираним и нетретираним јединкама. Након анализе диференцијално експримираних гена, биће анализирани епигенетичке промене на генима од интереса. Очекивано је да ове анализе укажу на промене у метилацији ДНК и модификације хистона. На крају, очекивано је да анализа диверзитета микробиоте присутне у фецесу пацова укаже да је постбиотик спречио или смањио дисбиозу, као и промене метаболичке активности присутне микробиоте изазване стресом.

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације пружиће значајан допринос разумевању утицаја постбиотика, добијених од анаеробних пробиотика будуће генерације који производе ГАБА, на патофизиологију, као и молекуларне и епигенетичке механизме у моделу депресије. На молекуларном нивоу, истраживање ефеката постбиотика на експресију гена и протеина повезаних са депресијом, допринеће разумевању путева повезаних са депресијом. Додатно, истраживање епигенетичких промена пружиће увид у механизме засноване на променама метилације ДНК и хистонских модификација које су повезане са депресијом. На крају, анализа микробиотске разноликости и функција у контексту депресије и утицаја постбиотика отвориће нове перспективе за развој будућих терапијских приступа који ће се ослањати на микробиоту, смањујући потребу за екстерним суплементима и минимизирајући ризик од нежељених ефеката који су често повезани са синтетичким супстанцама.

Најважнији литературни подаци који подржавају тему (до 10 референци)

1. Cipriani, A., Furukawa, T.A., Salanti, G., Chaimani, A., Atkinson, L.Z., Ogawa, Y., Leucht, S., Ruhe, H.G., Turner, E.H., Higgins, J.P.T., Egger, M., Takeshima, N., Hayasaka, Y., Imai, H., Shinohara, K., Tajika, A., Ioannidis, J.P.A., Geddes, J.R. (2018). Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet*. 391(10128):1357-1366. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32802-7.
2. Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 13(10):701-12. doi: 10.1038/nrn3346.
3. Schroeder, B.O., Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 22(10):1079-1089. doi: 10.1038/nm.4185.
4. Kasarello, K., Cudnoch-Jedrzejewska, A., Czarzasta, K. (2023). Communication of gut microbiota and brain via immune and neuroendocrine signaling. *Front Microbiol*. 14:1118529. doi: 10.3389/fmicb.2023.1118529.
5. Averina, O.V., Zorkina, Y.A., Yunes, R.A., Kovtun, A.S., Ushakova, V.M., Morozova, A.Y., Kostyuk, G.P., Danilenko, V.N., Chekhonin, V.P. (2020). Bacterial Metabolites of Human Gut Microbiota Correlating with Depression. *Int J Mol Sci*. 21(23):9234. doi: 10.3390/ijms21239234.
6. Duranti, S., Ruiz, L., Lugli, G.A., Tames, H., Milani, C., Mancabelli, L., Mancino, W., Longhi, G., Carnevali, L., Sgoifo, A., Margolles, A., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P., Turrone, F. (2020). *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Sci Rep*. 10(1):14112. doi: 10.1038/s41598-020-70986-z.
7. Feehily, C., Karatzas, K.A. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J Appl Microbiol*. 114(1):11-24. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05434.x.
8. Kelly, J.R., Borre, Y., O'Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., Kennedy, P.J., Beers, S., Scott, K., Moloney, G., Hoban, A.E., Scott, L., Fitzgerald, P., Ross, P., Stanton, C., Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2016). Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J Psychiatr Res*. 82:109-18. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.07.019.

Г. Закључак и предлог:

На основу достављеног образложења теме докторске дисертације и анализе литературе која подржава тему, Комисија закључује да је предмет истраживања предложене теме научно оправдан, актуелан и подржан адекватном методологијом, као и да кандидат Христина Д. Митровић задовољава све услове за успешну реализацију задатих циљева истраживања. Предложена докторска дисертација ће свеобухватним приступом, и уз коришћење савремених метода истраживања, допринети разумевању утицаја постбиотика, насталих од анаеробних бактерија, које производе ГАБА, на превенцију и ублажавање симптома депресије на физиолошком, молекуларном и епигенетичком нивоу. На основу изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета да прихвати ову тему под насловом **„Карактеризација анаеробних бактерија, произвођача γ -аминобутирне киселине, и њихова улога у превенцији и третману депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова”** и да одобри израду предложене докторске дисертације. За менторе се предлажу др Светлана Соковић Бајић, научни сарадник Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство и др Јелена Трајковић, доцент Универзитета у Београду - Биолошког факултета.

Београд, 10. 5. 2024.

Комисија:

др Светлана Соковић Бајић, научни сарадник,
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,

др Јелена Трајковић, доцент,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Невена Годоровић Вукотић, научни сарадник,
Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча“



ИНСТИТУТ ЗА МОЛЕКУЛАРНУ ГЕНЕТИКУ
И ГЕНЕТИЧКО ИНЖЕЊЕРСТВО
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Војводе Степе 444а | 11042 Београд | Република Србија
Тел. (011) 397 57 44 | Факс (011) 397 58 08 | т.р. 160-350089-28 | ПИБ 101736673

ИНСТИТУТ ЗА МОЛЕКУЛАРНУ ГЕНЕТИКУ
И ГЕНЕТИЧКО ИНЖЕЊЕРСТВО

Бр. 17/48
25.03.2024. год
БЕОГРАД

контакт: etickiodbor@imgge.bg.ac.rs

На основу Правилника о раду Етичког одбора Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, у складу са Одредбама и начелима садржаним у Хелсиншкој декларацији и Конвенцији Савета Европе о људским правима и биомедицини од 1997. године, Етички одбор Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду је на седници ЕО Ел. II/2024 одржаној дана 29.03.2024. године одлучивао о захтеву др Светлане Соковић Бајић и донео је

ОДЛУКУ О-ЕО-019/2024/1

Етички одбор ИМГГИ, УБ је сагласан са спровођењем истраживања која су предвиђена у оквиру докторске тезе кандидаткиње Христине Митровић

Образложење

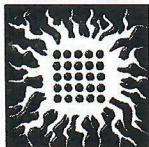
Чланови Етичког одбора су на електронској седници одржаној 29.03.2024.г размотрили захтев др Светлане Соковић Бајић, ментора докторанда Христине Митровић, да се наведеном докторанду одобри истраживање у саставу њене докторске тезе. Истраживања планирана у оквиру односне докторске тезе су саставни део студије "Изолација анаеробних бактерија из фекалног материјала здравих донора и испитивање модулаторних ефеката живих бактерија и њихових продуката", чији је руководиоца др Наташа Голић, а која је одобрена од стране Етичког одбора ИМГГИ УБ одлуком О-ЕО-19/2020. На основу приложене документације и сагласности руководиоца студије, Етички одбор ИМГГИ УБ је донео одлуку као у изреци.

Доставити:

- архиви Етичког одбора
- подносиоцу захтева




ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА
др Валентина Торђевић,
научни саветник, ИМГГИ, УБ



INSTITUT ZA NUKLEARNE NAUKE "VINČA"
INSTITUT OD NACIONALNOG ZNAČAJA ZA REPUBLIKU SRBIJU
UNIVERZITET U BEOGRADU

Adresa:
P. fah 522, 11001 Beograd
Matični broj: 07035250
PIB: 101877940

Telefon direktor: (011) 3408-104
E-mail: office@vinca.rs

др Милош Митић
Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња
Института за нуклеарне науке „Винча“
е-маил: milos.mitic@vinca.rs

Винча, 26.03.2024.
ИНСТИТУТ ЗА НУКЛЕАРНЕ НАУКЕ
ИНСТИТУТ ОД НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА ЗА РЕПУБЛИКУ СРБИЈУ
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
"ВИНЧА"
Бр. 24-DM50-007707
26. 03. 20 24 год
11001 БЕОГРАД-ВИНЧА, П П.522
Тел. (011) 3408101

На основу Пословника о употреби експерименталних животиња Института за нуклеарне науке „Винча“, Етичка комисија за рад са огледним животињама издаје

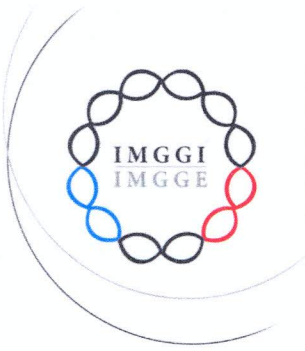
УВЕРЕЊЕ

Да је Христина Митровић, МСц биолог, истраживач приправник Групе за интеракције пробиотика и микробиоте са домаћином, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, на основу позитивног мишљења Етичке комисије 116-6/2020-000 и решења Министарства пољоприведе и заштите животине средине – Управа за Ветерину – број: 323-07-08974/2020-05 у оквиру пројекта „The use of integrative multi-omics approach in cultivation and characterization of gut bacteria related to microbiota-gut-brain axis as a source of Next Generation Probiotics“ стекла право коришћења животиња у експерименталне сврхе. Уверење се издаје именованој у циљу пријављивања докторске дисертације под називом: „Карактеризација анаеробних бактерија, произвођача γ -аминобутерне киселине, и њихова улога у превенцији и третману депресије изазване хроничним непредвидивим благим стресом код пацова“.

Винча, 26.03.2024. године

Председник Етичке комисије

др Милош Митић
виши научни сарадник



INSTITUTE OF MOLECULAR GENETICS
AND GENETIC ENGINEERING
University of Belgrade

Vojvode Stepe 444a | P. O. Box 23 | 11010 Belgrade | Republic of Serbia
Phone +381 11 397 57 44 | Fax +381 11 397 58 08

RESEARCH ETHICS COMMITTEE CERTIFICATE OF APPROVAL

O-EO-019/2020

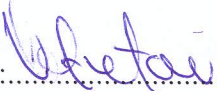
This is to certify that

Project title: "The use of integrative multi-omics approach in cultivation and characterization of gut bacteria related to microbiota-gut-brain axis as a source for Next Generation Probiotics"

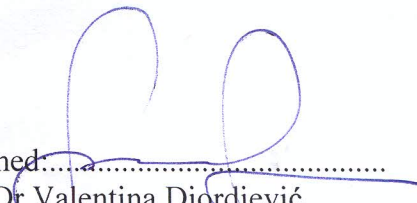
Principal Researcher: Dr Nataša Golić

was considered by the Research Ethics Committee of the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, at the meeting held on September 3rd, 2020 and was **APPROVED**.

Research Ethics Committee of the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade is organized and operates according to the Rules of Procedure of the Research Ethics Committee of the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade and relevant international ethical guidelines.

Signed: 
Violeta Evtov, LLB
Secretary, Research Ethics Committee



Signed: 
Dr Valentina Djordjević
Chair, Research Ethics Committee



ИНСТИТУТ ЗА МОЛЕКУЛАРНУ ГЕНЕТИКУ
И ГЕНЕТИЧКО ИНЖЕЊЕРСТВО
Универзитет у Београду

Војводе Степе 444а | П. Фах 23 | 11010 Београд | Република Србија
Тел. (011) 397 57 44 | Факс (011) 397 58 08 | т.р. 160-350089-28 | ПИБ 101736673

контакт: etickiodbor@imgge.bg.ac.rs

др Валентина Ђорђевић, виши научни сарадник
ИМГГИ, УБ, председник Етичког одбора
др Наташа Ковачевић Грујичић, виши научни сарадник
ИМГГИ, УБ, члан
др Бранка Зукић, виши научни сарадник ИМГГИ, УБ,
члан

др Горан Чутурило, педијатар, клинички
генетичар, доцент Медицинског факултета, УБ,
Универзитетска Дечја клиника, члан
Виолета Евтов, дипломирани правник, секретар
ИМГГИ, УБ, секретар Етичког одбора

На основу Правилника о раду Етичког одбора Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, у складу са Одредбама и начелима садржаним у Хелсиншкој декларацији и Конвенцији Савета Европе о Људским правима и биомедицини од 1997. године, Етички одбор Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду је на седници ЕЛ II/2020 одржаној дана 03.09.2020. године одлучивао о захтеву др Наташе Голић за одобрење студије и донео је

ОДЛУКУ О-ЕО-019/2020

Етички одбор ИМГГИ, УБ је сагласан са спровођењем научно-истраживачке студије: „Изолација анаеробних бактерија из фекалног материјала здравих донора и испитивање имуномодулаторних ефеката живих бактерија и њихових продуката“, чији је руководилац истраживања др Наташа Голић

Образложење

Чланови Етичког одбора су на седници одржаној 03.09.2020. године разматрали захтев др Наташе Голић за одобрење студије: „Изолација анаеробних бактерија из фекалног материјала здравих донора и испитивање имуномодулаторних ефеката живих бактерија и њихових продуката“. На основу приложене документације, Етички одбор је сходно овлашћењима из члана 32. и 36. Правилника о раду Етичког одбора ИМГГИ (бр. 19/167 од 07.04.2020.г.) донео одлуку као у изреци.

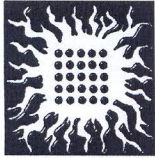
Доставити:

- архиви Етичког одбора
- подносиоцу захтева



Виолета Евтов
СЕКРЕТАР ЕТИЧКОГ ОДБОРА
Виолета Евтов, дипл. правник

др Валентина Ђорђевић
ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА
др Валентина Ђорђевић,
виши научни сарадник, ИМГГИ, УБ



VINCA INSTITUTE OF NUCLEAR SCIENCES
NATIONAL INSTITUTE OF THE REPUBLIC OF SERBIA
UNIVERSITY OF BELGRADE **БЕОГРАД ЗА НУКЛЕАРНЕ НАУКЕ**

Adress:
11001 Belgrade, P. O. Box 522
MBS 07035250
VAT 101877940

Director: (+381 11) 3408-104
E-mail: office@vinca.rs

Op. 116-6/2020-000
04.08. 2020 год.

11001 БЕОГРАД, П.п. 522
Official Gazette of RS

Pursuant to Article 33 and 34 of the Law on Animal Welfare ("Official Gazette of RS" No 41/09) and the Rulebook on requirements for registration in Register of experiments on animals and content and manner of keeping the Register, training program on welfare of experimental animals, form of request for conduction of experiment on animals, care, handling and the methods of killing of experimental animals, and content and manner of record on keeping, breeding, trade and experiments conducted on animals ("Official Gazette of RS" No 39/10) and institutional Rulebook for the care and use of laboratory animals of „VINČA" Institute of Nuclear Sciences - National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Ethical Committee reviewed research application submitted on 22.07.2020. by Nevena Todorovic Vukotic, PhD, Research Associate, and decided at session on 31/07/2020 to issue an

OPINION

that the use of laboratory animals within the planned experiment by **Nevena Todorovic Vukotic**, PhD, Research Associate, called "**In vivo characterization of 2 selected postbiotics in animal model of depression** (experiments proposed by project „**The use of integrative multi-omics approach in cultivation and characterization of gut bacteria related to microbiota-gut-brain axis as a source for Next Generation Probiotics**“), has an ethical justification for conducting the experiment. The opinion is issued to the applicant in order to apply for the project within the public call of **IDEAS**, which is announced by the Science Fund of the Republic of Serbia.

Note:

Category of Invasiveness: C
Category of Research: C

President of Ethical Committee for
the care and use of laboratory animals of
the VINČA Institute of Nuclear Sciences

Milos Mitic

Milos Mitic, PhD,
Assistant Research Professor

To deliver:

- To the applicant
- Veterinary Directorate - Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management of the Republic of Serbia
- Ethical Committee for the care and use of laboratory animals of the VINČA Institute of Nuclear Sciences - National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Serbia



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ

Управа за ветерину
Број: 323-07-08974/2020-05
Датум: 26.08.2020. године
Београд

Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде - Управа за ветерину, на основу члана 34. Закона о добробити животиња („Службени гласник РС“ број 41/09), члана 136. Закона о општем управном поступку („Службени гласник РС“ број 26/2018 и 95/18 - аутентично тумачење), члана 23. став 2. Закона о државној управи („Службени гласник РС“ број 79/05 и 101/07, 95/2010 и 99/2014, 47/18 и 30/18 и други закон) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије бр:119-01-5/14/2017-09 од 30.06.2017. године, решавајући по захтеву Института за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд, за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама. директор Управе за ветерину, Емина Милакара, доноси:

РЕШЕЊЕ

УСВАЈА СЕ захтев Института за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама, под називом:

"In vivo карактеризација 2 одабрана постбиотици у животињском моделу депресије", предложеног пројектом: "Култивација и карактеризација интерстиналних бактерија повезаних са "gut-brain" осом, употребом "multi-omics" приступа, као извор пробиотика нове генерације"/"In vivo characterization od 2 selected postbiotics in animal model of depression", proposed by project: "The use of integrative multi-omics approach in cultivation and characterization of gut bacteria related to microbiota-gut-brain axis as a source of Next Generation Probiotics", у оквиру програма ИДЕЈЕ, Фонда за науку Републике Србије.

Образложење

Институт за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд обратио се овом министарству дана 21.08.2020. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, под називом: "In vivo карактеризација 2 одабрана постбиотици у животињском моделу депресије", предложеног пројектом: "Култивација и карактеризација интерстиналних бактерија повезаних са "gut-brain" осом, употребом "multi-omics" приступа, као извор пробиотика нове генерације"/"In vivo characterization od 2 selected postbiotics in animal model of depression", proposed by project: "The use of integrative multi-omics approach in cultivation and characterization of gut bacteria related to microbiota-gut-brain axis as a source of Next Generation Probiotics", у оквиру програма ИДЕЈЕ, Фонда за науку Републике Србије.

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио и документацију прописану Законом о добробити животиња („Службени гласник РС“ број 41/09) и Правилником о условима

за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња, обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10) и то: податке о називу и седишти прабно лица, попуњен захтев за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, стручно мишљење Етичке комисије о спровођењу предметног огледа, Решење о упису у Регистар за огледе на животињама.

Приликом решавања по захтеву, увидом у приложену документацију, утврђено је да су стекли услови за доношење решења, као у диспозитиву, сходно одредбама члана 136. Закона о општем управном поступку („Службени гласник РС" број 26/2018 и 95/18 - аутентично тумачење).

Упутство о правном средству:

Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор, подношењем тужбе Управном суду Србије, у року од 30 дана од дана пријема решења.

в.д. ДИРЕКТОР

Емина Милакара



Доставити:

1. Института за нуклеарне науке "Винча", Михајла Петровића-Аласа 12-14, 11001 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1А/4, 11000 Београд
3. Евиденција
4. Архива