

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКОГ
ФАКУЛТЕТА

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидата **Александра Д. Бисенића**, мастер биохемичара.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 12. априла 2024. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидата **Александра Д. Бисенића**, мастер биохемичара, пријављене под насловом:

„Испитивање потенцијала анаеробних бактерија произвођача масних киселина кратког ланца као неуробиотика у мишијем моделу мултипле склерозе“

На основу поднете и прикупљене документације, као и у увида у досадашњи рад кандидата, подносимо Наставно-научном већу Хемијског факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А Биографски подаци о кандидату

Александар Бисенић је рођен 23.01.1997. године у Београду, Република Србија. Основне академске студије уписао је 2016. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду на Катедри за биохемију. Добитник је стипендије *Amgen* фондације за студентски истраживачки боравак на Каролинска институту у Стокхолму, Шведска 2018. године. Дипломирао је 2020. године са просечном оценом 9,94 (девет и 94/100) и оценом 10 (десет) на завршном раду под насловом „Експресија и пречишћавање рекомбинантног S2 домена S протеина SARS-CoV-2 из *E. coli*“, урађеним под менторством проф. др Марије Гавровић Јанкуловић. Добитник је награде „Ђорђе Стефановић“ за најбољег студента биохемије у 2020. години. Исте године је уписао мастер академске студије биохемије на Хемијском факултету Универзитета у Београду, које је завршио 2021. године са просечном оценом 10,00 (десет и 0/100) и оценом 10 (десет) на завршном раду под насловом „Рекомбинантна производња GST-тагованог S2 ектодомена SARS-CoV-2 у *E. coli* и имунохемијска

карактеризација“, такође урађеним под менторством проф. др Марије Гавровић Јанкуловић. Школске 2021/2022. године уписао је докторске академске студије на Хемијском факултету Универзитета у Београду, смер Биохемија. Израду докторске тезе је започео на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у групи за интеракције пробиотика и микробиоте са домаћином, под менторством др Јелене Ђокић, вишег научног сарадника. У току студија био је корисник стипендије Министарства просвете, науке и технолошког развоја. На седници Научног већа Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство 2021. године је изабран у звање истраживача приправника. Преко Петог позива младим истраживачима – студентима докторских академских студија за укључивање у научноистраживачки рад у акредитованим НИО у априлу 2022. године запослен је у групи за интеракције пробиотика и микробиоте са домаћином, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство. Члан је Биохемијског друштва Србије, Удружења микробиолога Србије, Српског друштва за молекуларну биологију, као и Сектора за трансфер технологија Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство. Области научног интересовања су му интеракције микробиоте црева са домаћином, имуномодулаторна својства бактеријских метаболита и биоинформатика.

Б Објављени научни радови и саопштења

Александар Бисенић има 1 научни рад објављен у међународном часопису изузетних вредности, 1 научни рад објављен у врхунском часопису националног значаја, 1 саопштење са међународног скупа и 2 саопштења са скупова националног значаја.

Целокупна библиографија докторанда, категорисана према Правилнику о стицању истраживачких и научних звања (Сл. Гласник РС, бр 159/2020-82), дата је у Прилогу 1 овог извештаја.

В Образложење теме

1. **Научна област:** Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације су анаеробне бактерије произвођачи масних киселина кратког ланца изоловане из фекалног материјала и испитивање њиховог потенцијала као неуробиотика за третирање мултипле склерозе.

Анаеробне бактерије ће бити изоловане из фекалног материјала здравих донора коришћењем посебних медијума, протокола и опреме за успостављање анаеробних услова, које ће потом бити идентификоване секвенцирањем дела гена за 16S rRNA.

Изоловане бактерије ће бити тестиране на продукцију масних киселина кратког ланца. Утицај на експресију протеина чврстих веза и антиинфламаторна својства одабраних изолата ће бити испитани на Caco-2 ћелијској линији као моделу епитела црева и на моноклеарним ћелијама периферне крви као моделу имунских ћелија, док ће утицај изолата на нервни систем домаћина бити испитиван на *C. elegans* као моделу домаћина. Промене нивоа експресије протеина чврсте везе, IL-8 и одабраних гена повезаних са нервним системом ће служити као критеријуми за одабир изолата за *in vivo* испитивање потенцијала бактерија произвођача масних киселина кратког ланца као неуробиотика на мишијем моделу мултипле склерозе. Ово истраживање за циљ има развој иновативних приступа за третирање мултипле склерозе базираних на модификовању микробиоте, метаболома црева и имунског одговора.

3. Научни циљ истраживања

Главни циљ тезе

Циљ ове тезе је испитати потенцијал коришћења бактерија произвођача масних киселина кратког ланца из црева као специјализованих постбиотика за третирање мултипле склерозе.

Специфични циљеви тезе

1. Успостављање протокола за изоловање и култивацију стриктно анаеробних бактерија црева; карактеризација метаболичке активности селектованих сојева (продукција SCFA); испитивање вирулентног потенцијала одабраних сојева (резистенција на антибиотике, хемолитичка активност, желатиназна активност);

2. *In vitro* карактеризација одабраних изолата у кокултури са моноклеарима периферне крви и епителним ћелијама црева (Caco-2 ћелијама) на којима ће бити испитана цитотоксичност изолата, имуномодулаторни ефекти и утицај на цревну баријеру;

3. *In vivo* испитивање потенцијала одабраних изолата да мењају експресију гена укључених у регулацију активности неурона на моделу *Caenorhabditis elegans*, и потенцијала ових изолата за третирање мултипле склерозе коришћењем мишијег модела експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.

4. Методе истраживања

Микробиолошке методе:

1. При изради ове докторске дисертације биће изоловане стриктно анаеробне бактерије из фекалног материјала здравих особа. У ту сврху ће бити коришћени хранљиви медијуми ради повећања вероватноће изоловања мање заступљених бактеријских врста, као и посебне компоненте, протоколи и опрема за успостављање услова довољно ниског редукционог потенцијала и концентрације кисеоника за раст стриктно анаеробних бактерија црева. То подразумева рад у анаеро комори при условима атмосфере: $N_2:CO_2:H_2 = 80:10:10$, и температуре од 36 °C.
2. Изучавање морфологије бактерија и разликовање Грам позитивних и Грам негативних бактерија на светлосном микроскопу – Бојење по Граму.
3. Мерење раста бактеријских култура (cfu/mL) методом серијских разблажења.
4. Испитивање антибиотских резистенција бактерија одређивањем МИС (енгл. Minimal Inhibitory Concentration).
5. Испитивање желатиназне активности култивацијом ћелија на чврстим подлогама са додатком желатина.
6. Испитивање хемолитичке активности култивацијом ћелија на чврстим подлогама са додатком крви.

Аналитичке методе:

1. Одређивање концентрације масних киселина кратког ланца у бактеријским културама помоћу HPLC (енгл. High Performance Liquid Chromatography).
2. Анализа метаболома бактеријских култура, мишијих серума, фецеса, бактеријских везикула помоћу HPLC-MS (енгл. High Performance Liquid Chromatography – Mass

Spectrometry).

Методе култивације ћелија:

1. Култивисање Сасо-2 ћелија, имортализованих ћелија пореклом од хуманог колоректалног аденокарцинома, као модела епитела црева подразумева класичне методе ћелијске културе, попут пасажирања, пребројавања и стокирања ћелија. За култивацију Сасо-2 ћелија ће се користити комерцијални медијум DMEM GlutaMAX са пируватом и високим садржајем глукозе. Комплетни медијум садржи 10% FCS (енгл. Fetal Calf Serum), као и пеницилин и стрептомицин. Ћелије се инкубирају на температури од 37 °C и концентрацији CO₂ од 5%.
2. Диференцирање Сасо-2 ћелија се изводи у плочама са 24 бунара са или без *transwell* инсерата редовном изменом медијума. Диференцијација траје 17 дана и почиње када ћелије постигну монослој.
3. Моделовање улоге имунског система у интеракцијама бактерија са епителом црева се постиже ко-култивацијом Сасо-2 ћелија са РВМС. РВМС се изолују из крви здравих донора методом градијента густине. Ко-култивација се постиже коришћењем *transwell* инсерата, са тим да се Сасо-2 ћелије узгајају изнад порозне мембране инсерата, а РВМС испод мембране, на дну бунара.

Имунохемијске методе:

1. Квантификација цитокина продукованих од стране РВМС ко-култивисаних са Сасо-2 ћелијама третираним бактеријским културама помоћу ELISA.
2. Одређивање нивоа експресије протеина (чврсте међућелијске везе, аутофагија, транскрипциони фактори) у различитим узорцима (Сасо-2 ћелије, ткива узоркована од мишева) методом Western Blot.
3. Анализа ћелијских инфилтратата у кичменој мождини, мозгу и цревима изолованим из мишева којима је изазиван ЕАЕ или су служили као контроле, као и морфологија чврстих веза у цревима на пресецима ових ткива након бојења хематоксилин-еозин и имунохистохемијског обележавања антигена од интереса комерцијалним антителима. Овако обележени пресеци ткива биће анализирани на светлосном односно флуоресцентном микроскопу.
4. Имунофенотипизација ћелија ткива у суспензији изолованих из мишева којима је изазиван ЕАЕ или су служили као контроле биће урађена коришћењем

комерцијалних антитела и узорци ће бити анализирани помоћу проточног цитометра и одговарајућих програма за обраду података (FlowJo, FCS express).

In vitro методе испитивања интеракција бактерија са домаћином:

1. Третирање Сасо-2 ћелија као модела епитела црева домаћина бактеријским културама и/или ванћелијским везикулама бактерија.
2. Одређивање цитотоксичности бактерија на Сасо-2 ћелијама коришћењем комерцијалних китова за мерење активности лактат дехидрогеназе.
3. Мерење нивоа експресије гена од интереса на нивоу информационе RNA (чврсте међућелијске везе, гени повезани са функцијом нервног система и инфламацијом) у различитим узорцима (Сасо-2 ћелије третиране бактеријама, *C. elegans*, ткива узоркована од мишева) методом qPCR (енгл. Quantitative Polymerase Chain Reaction).
4. Квантификација ефекта бактерија на интегритет цревне баријере у култури диференцираних Сасо-2 ћелија коришћењем уређаја за мерење TEER.

Изоловање и пречишћавање ванћелијских везикула бактерија:

1. Изоловање бактеријских везикула коришћењем ултрацентрифуге и градијента густине.
2. Пречишћавање бактеријских везикула коришћењем SEC (енгл. Size Exclusion Chromatography).

Мишији модел мултипле склерозе:

1. *In vivo* тестирање ефеката бактерија на C57BL/6 мишевима којима је изазван ЕАЕ као модел мултипле склерозе (праћење симптома ЕАЕ, узорковање фецеса, садржаја и ткива различитих делова црева, као и ткива слезине, мозга, кичмене мождине, лимфних чворова, Пејерових плоча). Индукција ЕАЕ ињекцијом фрагмента мијелин-олигодендроцитног протеина у комбинацији са комплетним Freund-ovim адјувансом и токсином *Bordetella pertussis*. Третирање мишева потенцијалним неуробиотицима конзумирањем бактеријских култура *ad libitum*.

Секвенцирање нове генерације (енгл. Next Generation Sequencing, NGS) и биоинформатичке методе:

1. Идентификација изолата секвенцирањем дела гена за 16S rRNA и поређењем секвенци са секвенцама из NCBI базе података помоћу BLAST алата.
2. Анализа *short-* и *long-read* података добијених методом секвенцирања целог генома

(енгл. Whole Genome Sequencing, WGS) на различитим платформама (Illumina, Oxford Nanopore Technologies). Обрада сирових података и анализа генома ће подразумевати следеће алате: FastQC (провера квалитета сирових података), fastp (уклањање индекс секвенци, адаптера и секвенци лошег квалитета), SPAdes (*de novo* склапање генома), Kraken (таксономске анализе) и Prokka (функционална анотација генома), али и друге биоинформатичке и статистичке методе.

3. Анализа података добијених методом *shotgun* метагеномског секвенцирања и секвенцирањем дела гена за 16S rRNA на платформи Illumina са циљем одређивања таксономског састава и метаболичког потенцијала фекалне микробиоте. Обрада сирових података и анализа метагенома добијених секвенцирањем дела гена за 16S rRNA ће подразумевати следеће алате: QIIME2, LEfSe, PICRUSt2 и R скрипте. Обрада *shotgun* метагеномских података ће подразумевати коришћење FastQC, KneadData, Kraken, Bracken и HUMAnN алата, као и R скрипти. Додатни статистички тестови, као и графички приказ резултата ће бити урађени коришћењем GraphPad Prism.

5. Актуелност проблематике

Микробиота црева представља заједницу микроорганизама (бактерија, гљива и вируса) који настајују лумен црева домаћина. Ови микроорганизми имају важан утицај на здравље домаћина, а најважније функције којима доприносе су метаболичка ефикасност у варењу хране, отпорност на патогене микроорганизме и регулација развоја и активности имунског система.

Промене у саставу и метаболизму микробиоте црева су доведене у везу са великим бројем патолошких стања повезаних са поремећеном функцијом имунског система, као што су алергије, тумори и аутоимунске болести. С обзиром на то да се учесталост обољења са аутоимунском компонентом повећава, нарочито у развијеним земљама, постоји повећана потреба за идентификацијом фактора одговорних за развој болести, као и нових стратегија превенције и терапија.

Мултипла склероза (МС) је аутоимунско обољење у којем долази до оштећења мијелинског омотача неурона централног нервног система (ЦНС). Последице могу да буду отежано или онемогућено спровођење сигнала у деловима ЦНС, што може довести до

симптома попут слабљења мишића, отежане координације тела, губитка вида, умора и когнитивних проблема. Већа заступљеност симптома попут констипације, повећане пропустљивости и инфламације црева у особама које болују од МС (Buscarinu, 2017), заједно са чињеницом да бактерије црева могу да утичу на пропустљивост крвно-мождане баријере, указују на потенцијалну везу између ЦНС и црева. Веза између развоја МС и промена у микробиоти црева је додатно поткрепљена метагеномским и метаболомичким студијама. Бројни бактеријски родови су идентификовани као мање заступљени у пацијентима који болују од МС, од којих су неки: *Coprococcus*, *Butyricimonas* и *Prevotella* (Chen, 2016; Jangi, 2016; Zeng, 2019). Бактерије ових родова су познати произвођачи масних киселина кратког ланца (engl. Short Chain Fatty Acid – SCFA). Последице, концентрација већине SCFA у цревима је такође смањена у МС (Zeng, 2019).

SCFA представљају групу органских киселина са изузетно важном улогом у интеракцијама микробиоте и домаћина. Настају ферментацијом комплексних полисахарида унетих исхраном од стране одређених бактерија микробиоте црева, већински у дебелом цреву. Домаћин SCFA препознаје преко рецептора спрегнутих са Г протеином (engl. G protein Coupled Receptor – GPCR). Најзаступљенији рецептори за SCFA у ћелијама домаћина су GPR43 и GPR41. Рецептор GPR43 се већински експримира у ћелијама епитела гастроинтестиналног тракта, имунским ћелијама и у мањој мери у адипоцитима. Са друге стране, GPR41 се експримира у већем броју различитих ћелија, попут епитела црева, адипоцита, слезине, лимфних чворова, полиморфонуклеарних леукоцита и ћелија периферног нервног система. Постоје и додатни мање распрострањени и мање специјализовани рецептори, као што су GPR109a/HCAR2 и GPR164, који такође могу да се активирају везивањем SCFA. (Corrêa-Oliveira, 2016)

Масним киселинама кратког ланца се приписују бројна својства од користи по домаћина. Служе као важан извор енергије: бутират већински бива искоришћен од стране ћелија епитела дебелог црева, док се ацетат транспортује циркулацијом до јетре, где се користи у процесу глуконеогенезе. Повећањем нивоа експресије протеина чврстих међућелијских веза, SCFA доводе до смањења пропустљивости цревне баријере, даље смањујући вероватноћу транслокације бактерија црева у организам и настанка локалне или чак системске инфламације, повезане са бројним патолошким стањима (Peng, 2009).

Садржај SCFA у фецесу особа оболелих од МС је значајно смањен, у тој мери да их је у

неким случајевима немогуће детектовати (Zeng, 2019). Садржај укупних и појединачних SCFA корелира и са тежином клиничке слике, па је релативна заступљеност бутерне и капронске киселине смањена, а релативна заступљеност сирћетне киселине повећана у фецесу пацијената са интензивнијим симптомима. Смањена концентрација SCFA је забележена и у серуму MC пацијената (Duscha, 2020). Поремећаји у концентрацијама SCFA утичу и на функцију имунског система. Показано је да смањена заступљеност Treg ћелија и повећана заступљеност Th17 ћелија у MC пацијентима корелира са променама у заступљености одређених бактеријских таксона у цревима, као и са концентрацијама SCFA у фецесу и серуму (Duscha, 2020; Zeng, 2019). Повезаност промена у заступљености чланова микробиоте који продукују SCFA и функцији имунских ћелија као што су дендритске ћелије, макрофаги, супресорске ћелије мијелоидног порекла, T лимфоцити и лимфоцити природне убице показана је и на пацовском моделу мултипле склерозе, односно експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису (EAE) (Radojević, 2022). Показано је да инхибиција хистон деацетилазе (HDAC) под утицајем SCFA у мононуклеарним ћелијама и неутрофилима доводи до инактивације NFκB и смањене експресије про-инфламаторних цитокина. Инхибиција деацетилације, која доводи до повећане експресије *foxp3*, је управо начин на који SCFA поспешују супресивну активност Treg ћелија (Тао, 2007). Још један вид модификације хистона релевантан за SCFA је кротонилација. У физиолошким условима, овај процес је најинтензивнији у цревима и мозгу, а завистан је од SCFA, са бутиратом као главним инхибитором декротонилишуће активности HDAC (Fellows, 2018). Ова активност SCFA се приписује молекулима у циркулацији и пример је дисталних ефеката SCFA продукованих од стране микробиоте црева на мозак.

С обзиром на обим литературе која указује на значај интеракција микробиоте црева и домаћина, интервенције на нивоу микробиоте и метаболома црева представљају обећавајући приступ за развој нових терапеутских решења за третирање болести повезаних са неконтролисаним активацијом имунског система, као што је случај у мултиплој склерози.

Хипотезе:

1. Ниво продукције масних киселина кратког ланца доприноси потенцијалу бактерија изолованих из фекалног материјала здравих донора да очувају састав и функцију микробиоте, регулишу имунски одговор и очувају интегритет цревне баријере.

2. Применом бактерија произвођача масних киселина је могуће ублажити симптоме мултипле склерозе регулацијом осе микробиота-црева-имунски систем-мозак.

6. Очекивани резултати

Први резултати ове докторске тезе биће везани за изоловање стриктно анаеробних бактерија из фецеса здравих донора. Током овог истраживања биће успостављена колекција изолата бактерија идентификованих секвенцирањем дела гена за 16S rRNA, на основу којег ће се извршити иницијална селекција оних бактерија које би по литературним подацима могле да имају потенцијал за продукцију SCFA. Бактерије идентификоване као „некултивисане“ анализом секвенце дела гена за 16S rRNA ће такође бити селектоване за даљу карактеризацију.

Користећи HPLC уређај опремљен UV детектором, биће могуће утврдити потенцијал селектованих изолата да продукују SCFA, као и факторе који утичу на ниво продукције SCFA у кораку оптимизације услова и састава медијума за култивисање бактерија. Резултат овог дела истраживања биће дефинисање састава медијума који подстичу продукцију SCFA од стране селектованих бактерија. Резултати добијени анализом метаболита у бактеријским културама масеном спектрометријом, заједно са резултатима са HPLC-UV о продукцији SCFA, ће омогућити интерпретацију резултата даљих експеримената у контексту метаболичког потенцијала испитиваних бактерија.

Из дела истраживања у којима ће се испитивати интеракције изолата са Caco-2 ћелијама третираним проинфламаторним цитокинима као моделом инфламације црева домаћина, проистећи ће резултати који ће указати на утицај ових бактерија на интегритет цревне баријере и на продукцију проинфламаторних цитокина од стране ових ћелија. С обзиром на чињеницу да је интегритет цревне баријере нарушен код MC пацијената као последица локалне инфламације (Buscarini, 2017), а имајући у виду да студије указују на нарушену цревну баријеру као фактор који доприноси развоју бројних патолошких стања (дијабетес, гојазност итд.), ови резултати ће бити од велике важности у процени пробиотског потенцијала селектованих изолата.

Улога имунског система у интеракцији бактерија са епителом црева ће бити моделована ко-култивацијом Caco-2 ћелија са PVMC (енгл. Peripheral Blood Mononuclear Cells) коришћењем *transwell* инсерата. Резултат ових истраживања указаће на потенцијал

испитиваних бактерија да спрече ефекте продуката стимулираних РВМС на Сасо-2 ћелије (интегритет цревне баријере, продукција цитокина) и да деловањем на Сасо-2 ћелије утичу на активност РВМС.

Утицај изолата на нервни систем ће бити испитан на *C. elegans* као моделу домаћина. Након третмана, из сакупљених *C. elegans* ће бити изолована RNA и методом qPCR ће бити испитан ниво експресије гена повезаних са неуропептидима, као и синтезом и ослобађањем неуротрансмитера за које је показано да су од значаја у неуродегенеративним болестима.

Ослањајући се на резултате из горе наведених експеримената, у *in vivo* експериментима на C57BL/6 мишевима којима је изазван експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (ЕАЕ), два изолата са највећим потенцијалом за примену у третирању МС биће понуђена животињама *ad libitum*. Експерименти на мишевима ће показати утицај испитиваних изолата на симптоме ЕАЕ. Анализом ткива узоркованих на врхунцу болести (мозак и кичмена можина, слезина, лимфни чворови и Пејерове плоче, различити делови црева: дуоденум, јејунум, илеум, цекум и колон) ће бити испитан утицај бактерија на регулацију имунског одговора, као и потенцијал бактерија да стимулишу регулаторне и имunosупресивне путеве повећањем заступљености и активности ћелија попут имunosупресивних ћелија мијелоидног порекла (толерогене дендритске ћелије, супресивне ћелије мијелоидног порекла, супресивни макрофаги), и регулаторних Т ћелија, кључних за ефикасну терапију аутоимунских обољења. Мерење концентрације SCFA и других метаболита у серумима третираних животиња ће помоћи у објашњавању потенцијалних дисталних ефеката примењених бактерија на централни нервни систем мишева. Услужно секвенцирање нове генерације (*shotgun* секвенцирање и секвенцирање дела гена за 16S rRNA) на платформи Illumina ће бити коришћено за одређивање таксономског састава и метаболског потенцијала микробиоте из узорака фецеса прикупљених пре индукције болести и на врхунцу болести, као и садржаја различитих делова црева.

Додатно, да би се урадила потпуна претрага генома одабраних изолата, на истој платформи урадиће се секвенцирање читавих генома изолата од интереса.

Г Закључак

Комисија сматра да је предложена тема научно заснована и актуелна, а очекивани резултати би представљали значајан допринос у области биохемије интеракција микробиоте црева са домаћином. Предложена тема докторске дисертације је научно утемељена и оправдана. Планираним начином истраживања могу се реализовати дефинисани циљеви докторске дисертације. У складу са Законом о високом образовању и Статутом Универзитета у Београду - Хемијског факултета, сматрамо да кандидат испуњава све потребне услове да му се одобри израда предложене докторске дисертације. На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да прихвати тему кандидата Александра Д. Бисенића, мастер биохемичара, и одобри израду докторске дисертације под насловом: „Испитивање потенцијала анаеробних бактерија произвођача масних киселина кратког ланца као неуробиотика у мишијем моделу мултипле склерозе“ као научно оправдане.

За менторе предлажемо др Марију Гавровић Јанкуловић, редовног професора Универзитета у Београду - Хемијског факултета и др Јелену Ђокић, вишег научног сарадника Универзитета у Београду - Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство. Списак радова предложених ментора из којих се може видети да испуњавају услове стандарда за акредитацију студијских програма дати су у Прилогу 2 и Прилогу 3.

Београд, 26. април 2024. године

Комисија:

др Марија Гавровић Јанкуловић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

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

др Милица Поповић, ванредни професор,
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Литература

1. Buscarinu, M. C., Cerasoli, B., Annibaldi, V., Policano, C., Lionetto, L., Capi, M., ... & Ristori, G. (2017). Altered intestinal permeability in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: A pilot study. *Multiple Sclerosis Journal*, 23(3), 442-446.
2. Chen, J., Chia, N., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Novotna, M., Paz Soldan, M. M., ... & Mangalam, A. K. (2016). Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
3. Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., ... & Weiner, H. L. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature communications*, 7(1), 12015.
4. Zeng, Q., Gong, J., Liu, X., Chen, C., Sun, X., Li, H., ... & Lu, Y. (2019). Gut dysbiosis and lack of short chain fatty acids in a Chinese cohort of patients with multiple sclerosis. *Neurochemistry international*, 129, 104468.
5. Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. R. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & translational immunology*, 5(4), e73.
6. Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1619-1625.
7. Duscha, A., Gisevius, B., Hirschberg, S., Yissachar, N., Stangl, G. I., Dawin, E., ... & Haghikia, A. (2020). Propionic acid shapes the multiple sclerosis disease course by an immunomodulatory mechanism. *Cell*, 180(6), 1067-1080.
8. Radojević, D., Bekić, M., Gruden-Movsesijan, A., Ilić, N., Dinić, M., Bisenić, A., ... & Tomić, S. (2022). Myeloid-derived suppressor cells prevent disruption of the gut barrier, preserve microbiota composition, and potentiate immunoregulatory pathways in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Gut Microbes*, 14(1), 2127455.
9. Tao, R., De Zoeten, E. F., Özkaynak, E., Chen, C., Wang, L., Porrett, P. M., ... & Hancock, W. W. (2007). Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nature medicine*, 13(11), 1299-1307.

10. Fellows, R., Denizot, J., Stellato, C., Cuomo, A., Jain, P., Stoyanova, E., ... & Varga-Weisz, P. (2018). Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nature communications*, 9(1), 105.

Прилог 1: Библиографија докторанда, категорисана према Правилнику о стицању истраживачких и научних звања (Сл. Гласник РС, бр. 159/2020-82)

Научни радови објављени у међународним часописима изузетних вредности – М21а

Radojević, D., Bekić, M., Gruden-Movsesijan, A., Ilić, N., Dinić, M., **Bisenić, A.**, ... & Tomić, S. (2022). Myeloid-derived suppressor cells prevent disruption of the gut barrier, preserve microbiota composition, and potentiate immunoregulatory pathways in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Gut Microbes*, 14(1), 2127455.

Научни радови објављени у врхунским часописима националног значаја – М51

Radojević, D., Bajić, S. S., Dinić, M., **Bisenić, A.**, Đokić, J., & Golić, N. (2023). The Microbiome-Gut-Brain Axis in Multiple Sclerosis. *Archives of Pharmacy*, 73(Notebook 6), 441-462.

Остали научни радови

Golic N., Jakovljevic S., **Bisenic A.** *Diabetes and microbiota* *Microb Health Dis* **2022**; 4: e782
DOI: 10.26355/mhd_20229_782

Научна саопштења са међународних скупова штампаних у изводу – М34

Tolinački M., Soković Bajić S., Brdaric E., Radojević D., **Bisenic A.**, Šarić A., Đorđević M., Tolić A., Rajić J., Živković M. Continuous treatment with *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 - influence on activation of various metabolic processes and gut microbiota composition - the improvement of health of diabetic rats. Conference - 12th Probiotics, Prebiotics & New foods - Rome , Italy, **2023**, 56, p.101.

Научна саопштења са скупова националног значаја штампаних у изводу – М64

Dinić, M., **Bisenić, A.**, Jakovljević, S., Nastasijević, B., Brdarić, E., Soković Bajić, S., ... & Golić, N. (2023). Short chain fatty acid producing faecalimonas sp. NGB245 isolated from human gut modulates neurosignaling in *Caenorhabditis elegans*. In *CoMBoS2—the Second Congress of Molecular Biologists of Serbia, Abstract Book—Trends in Molecular Biology, Special issue 06-08 October 2023, Belgrade, Serbia* (pp. 124-124). Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE), University of Belgrade.

Радојевић, Д., Бекић, М., Груден-Мовсесијан, А., Илић, Н., Динић, М., **Бисенић, А.**, Голић, Н., Вучевић, Д., Ђокић, Ј., Томић, С. „Супресорске ћелије мијелоидног порекла одржавају функције цревне баријере, својства микробиоте црева и потенцирају имунорегулаторне путеве у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код пацова“, Научни скуп, Светски дан имунологије, Београд, Србија, 27. април 2023. Књига сажетака, стр. 9.

Прилог 2: Изабрани радови предложеног ментора др Марије Гавровић Јанкуловић:
Спискови радова предложених ментора објављених у научним часописима са Science Citation Index (SCI) листе који квалификују менторе за вођење докторске дисертације:

Име и презиме ментора: др Марија Гавровић Јанкуловић

Звање: редовни професор

Изабрани радови предложеног ментора:

1. Protić-Rosić, I., Lopandić, Z., Popović, D., Blagojević, G., & Gavrović-Jankulović, M. (2024). rBet v 1a-BanLecwt induce upregulation of IL-10 and IFN- γ gene expression in Caco-2/THP-1 co-culture and secretion of IL-10 and IFN- γ /IL-4 levels in PBMCs of birch pollen allergic donors. *International Immunopharmacology*, 129, 111607. DOI 10.1016/j.intimp.2024.111607
2. Cavic, M., Nestic, A., Mirjagic Martinovic, K., Vuletic, A., Besu Zizak, I., Tisma Miletic, N., ... & Gavrovic-Jankulovic, M. (2023). Detection of humoral and cellular immune response to anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in breastfeeding women and naïve and previously infected individuals. *Scientific Reports*, 13(1), 6271. DOI 10.1038/s41598-023-33516-1
3. Protić-Rosić, I., Nešić, A., Lukić, I., Miljković, R., Popović, D. M., Atanasković-Marković, M., ... & Gavrović-Jankulović, M. (2021). Recombinant Bet v 1-BanLec chimera modulates functional characteristics of peritoneal murine macrophages by promoting IL-10 secretion. *Molecular Immunology*, 138, 58-67. DOI 10.1016/j.molimm.2021.06.015
4. Nešić, A., Čavić, M., Popović, M., Zlatanova, M., Pieters, R., Smit, J., & Gavrović-Jankulović, M. (2019). The kiwifruit allergen act d 1 activates NF- κ B signaling and affects mRNA expression of TJ proteins and innate pro-allergenic cytokines. *Biomolecules*, 9(12), 816. DOI 10.3390/biom9120816
5. Nešić, A., Stam, A., Čavić, M., Ten Klooster, J. P., Pieters, R., Smit, J., & Gavrović-Jankulović, M. (2019). Activation of epithelial cells by the major kiwifruit allergen Act d 1 in human and mouse-derived intestinal model. *Journal of functional foods*, 62, 103556. DOI 10.1016/j.jff.2019.103556

Прилог 3: Изабрани радови предложеног ментора др Јелене Ђокић: Спискови радова предложених ментора објављених у научним часописима са Science Citation Index (SCI) листе који квалификују менторе за вођење докторске дисертације:

Име и презиме ментора: др Јелена Ђокић

Звање: виши научни сарадник

Изабрани радови предложеног ментора:

1. Tertel, T., Tomić, S., Đokić, J., Radojević, D., Stevanović, D., Ilić, N., ... & Kosanović, M. (2022). Serum-derived extracellular vesicles: Novel biomarkers reflecting the disease severity of COVID-19 patients. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(8), e12257. DOI 10.1002/jev2.12257.
2. Radojević, D., Tomić, S., Mihajlović, D., Tolinački, M., Pavlović, B., Vučević, D., ... & Đokić, J. (2021). Fecal microbiota composition associates with the capacity of human peripheral blood monocytes to differentiate into immunogenic dendritic cells in vitro. *Gut Microbes*, 13(1), 1921927. DOI 10.1080/19490976.2021.1921927.
3. Radojević, D., Bekić, M., Gruden-Movsesijan, A., Ilić, N., Dinić, M., Bisenić, A., ... & Tomić, S. (2022). Myeloid-derived suppressor cells prevent disruption of the gut barrier, preserve microbiota composition, and potentiate immunoregulatory pathways in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Gut Microbes*, 14(1), 2127455. DOI 10.1080/19490976.2022.2127455.
4. Dinić, M., Herholz, M., Kačarević, U., Radojević, D., Novović, K., Đokić, J., ... & Golić, N. (2021). Host–commensal interaction promotes health and lifespan in *Caenorhabditis elegans* through the activation of HLH-30/TFEB-mediated autophagy. *Aging (Albany NY)*, 13(6), 8040. DOI 10.18632/aging.202885.
5. Bajić, S. S., Đokić, J., Dinić, M., Tomić, S., Popović, N., Brdarić, E., ... & Tolinački, M. (2020). GABA potentiate the immunoregulatory effects of *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 via ATG5-dependent autophagy in vitro. *Scientific Reports*, 10(1), 1347. DOI 10.1038/s41598-020-58177-2.



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. 17/51

29-03-2024. 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. П/2024 одржаној дана 29.03.2024. године одлучивао о захтеву др Јелена Ђокић и донео је

ОДЛУКУ О-ЕО-019/2024/2

Етички одбор ИМГГИ, УБ је сагласан са спровођењем истраживања која су предвиђена у оквиру докторске тезе кандидата Александра Бисенића.


Образложење

Чланови Етичког одбора су на електронској седници одржаној 29.03.2024.г размотрили захтев др Јелене Ђокић, ментора докторанда Александра Бисенића, да се наведеном докторанду одобри истраживање у саставу његове 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



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

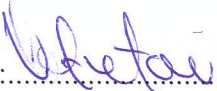
This is to certify that

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"

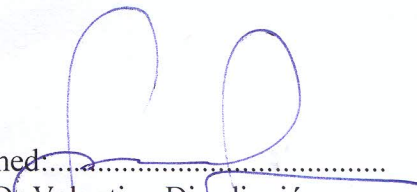
Principal Researcher: Dr Nataša Golić

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. Факс 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