

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 26.01.2017. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Uticaj suplementacije sojem *Lactobacillus helveticus* L10 na markere imunološkog i oksidativnog statusa vrhunskih sportista**“, kandidata magistra farmacije Danice Michaličkove (rođ. Marinković), studenta doktorskih studija na Katedri za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u sledećem sastavu:

1. Dr sc. Brižita Đorđević – mentor rada, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
2. Dr sc. Rajna Minić – viši naučni saradnik, Odsek za istraživanje i razvoj, Institut za virusologiju, vakcine i serume, Torlak,
3. Dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević – vanredni profesor, Katedra za medicinsku biohemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
4. Dr sc. Nataša Golić – naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu i
5. Dr sc. Bojana Vidović – docent, Katedra za bromatologiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Posle pregledane disertacije podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija je napisana na 166 strana, ima 22 tabele, 26 slika i 342 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (47 strana), Ciljevi istraživanja (1 strana), Materijal i metode (29 strana), Rezultati (25), Diskusija (19 strana), Zaključci (2 strane) i Literatura.

U poglavlju **Uvod** dat je detaljan prikaz dosadašnjih saznanja iz oblasti koje su neposredno vezane za predmet disertacije. U prvom delu uvoda opisani su fiziološki efekti fizičke aktivnosti (FA). Detaljno je objašnjen uticaj FA na parametre humoralnog, celularnog i mukoznog imuniteta, kao i povezanost FA sa učestalošću infekcija gornjeg respiratornog trakta kod vrhunskih sportista. Pored toga, objašnjena je uloga ishrane i dijetetskih suplemenata u održavanju adekvatnog imunskog odgovora. Zatim je opisan

uticaj umerene i intenzivne FA na oksidativni status. Predstavljani su izvori oksidativnog stresa kod vrhunskih sportista, kao i mehanizmi antioksidativne zaštite. U sledećem delu poglavlja Uvod predstavljene su najvažnije uloge i svojstva humane gastrointestinalne mikrobiote, a zatim su predstavljena dosadašnja saznanja o uticaju FA na njen sastav. U nastavku su prikazani probiotski sojevi i njihova interakcija sa komponentama imunskog sistema. Na kraju poglavlja dat je pregled dostupnih literaturnih podataka o upotrebi probiotskih sojeva u populaciji sportista.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su sledeći: ispitati da li suplementacija sojem *L. helveticus* Lafti® L10, utiče na pojavu, dužinu trajanja i težinu simptoma infekcija gornjeg respiratornog trakta u populaciji vrhunskih sportista; proceniti efekte suplementacije sojem *L. helveticus* Lafti® L10 i intenzivnih treninga na odabrane parametre mukoznog, humoralnog i celularnog imuniteta; proceniti efekte suplementacije sojem *L. helveticus* Lafti® L10 i intenzivnih treninga na odabrane biohemijske parametre (lipidni status, glukoza, bilirubin, mokraćna kiselina i albumin); proceniti efekte suplementacije sojem *L. helveticus* Lafti® L10 i intenzivnih treninga na parametre oksidativnog stresa, oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite; ispitati da li suplementacija sojem *L. helveticus* Lafti® L10 utiče na sportske performanse (nivo maksimalnog aerobnog kapaciteta), antropometrijske parametre i telesnu kompoziciju; ispitati da li suplementacija sojem *L. helveticus* Lafti® L10 utiče na subjektivni osećaj anksioznosti, depresije, borbenosti, konfuznosti, snage, zamora, kao i totalnog osećaja uznemirenosti.

U poglavlju **Ispitanici i metode** su dati podaci o eksperimentalnom dizajnu studije, ispitanicima i primenjenim metodama. Ispitivanje je sprovedeno kao randomizovana, dvostruko slepa, placebo-kontrolisana klinička studija. Eksperimentalna grupa (označena sa Lafti® L10) obuhvatila je 20 ispitanika, koji su primali kapsule *L. helveticus* Lafti® L10 u dozi od $2 \cdot 10^{10}$ CFU (2 kapsule) proizvođača *Lallemand Health Solutions*, Montreal, Kanada. Kontrolna (placebo) grupa uključila je 19 ispitanika koji su primali placebo kapsule, identične po ukusu i izgledu kapsulama eksperimentalne grupe. U istraživanju su učestvovali vrhunski sportisti. Podela ispitanika po grupama i protokol studije je opisan u odeljku *Eksperimentalni dizajn studije i ispitanici*. U odeljku *Kardiopulmonalni test* opisan je postupak ergospirometrijskog ispitivanja za određivanje maksimalnog aerobnog kapaciteta (VO_{2max}). U odeljku *Uputnici* opisani su upitnici koji su korišćeni za praćenje intenziteta FA, učestalosti respiratornih infekcija i stanja raspoloženja sportista tokom studije. U odeljku *Laboratorijske metode*, detaljno su opisane primenjene biohemijske metode za analizu prikupljenih bioloških uzoraka (krvi i salive). Poslednji odeljak ovog poglavlja *Statistička obrada podataka* odnosi se na prikaz statističkih metoda korišćenih u obradi dobijenih rezultata.

Originalni rezultati koji su dobijeni u okviru ove doktorske disertacije prikazani su u poglavlju **Rezultati**. U prvom delu ovog poglavlja prikazane su osnovne karakteristike učesnika obe grupe: rezultati antropometrijskih merenja i nutritivne analize dnevnika ishrane sportista, koji su zatim upoređeni sa preporučenim

vrednostima. U odeljku *Procena respiratornih i gastrointestinalnih simptoma* dat je prikaz učestalosti respiratornih infekcija, kao i težine respiratornih simptoma. U nastavku su prikazani rezultati uticaja suplementacije sojem *L. helveticus* L10 na parametre mukoznog, celularnog i humoralnog imuniteta. Zatim su prikazani rezultati parametara oksidativnog statusa i konvencionalnih biohemijskih parametara. U poslednjem delu poglavlja Rezultati dat je prikaz uticaja suplementacije na sportske performanse.

U poglavlju **Diskusija** predstavljena je uporedna analiza rezultata disertacije sa dostupnim literaturnim podacima.

Na kraju disertacije, dati su **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (342) citiranih APA stilom.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U prvom delu istraživanja prikazan je profil ispitanika obe grupe. Fizički i antropometrijski parametri učesnika se nisu značajno razlikovali među grupama, kako na početku, tako ni na kraju studije. Telesna kompozicija sportista se nije promenila ni u jednoj grupi tokom studije. Nije utvrđena statistički značajna razlika u intenzitetu FA, kao ni u dijetarnom unosu među grupama. Analiza trodnevnog dnevnika ishrane je ukazala da je unos mikronutrijenata bio manji od preporučenih vrednosti.

Učestalost javljanja respiratornih infekcija tokom studije se nije značajno razlikovao. Zabeležen je trend smanjenja težine respiratornih simptoma ($p=0,078$). Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 je skratila trajanje respiratorne infekcije za oko 3 dana ($7,3\pm 2,9$ nasuprot $10\pm 4,7$ dana, srednja vrednost \pm standardna devijacija; $p=0,047$). Takođe, u probiotskoj grupi je zabeležen manji broj respiratornih simptoma ($4,9\pm 1,9$ nasuprot $6,9\pm 1,2$). Razlika između grupa u broju suplemenata/lekova bez recepta, kao i u dužini njihovog korišćenja nije primećena. Broj zabeleženih GIT infekcija je bio isuviše nizak za izvođenje detaljnije statističke analize i donošenje odgovarajućih zaključaka.

Zabeležena je značajna razlika između grupa (35%, -1,4, - 53%; $p=0,03$) za nivo sIgA antitela. Uočen je značajan pad nivoa salivarnih IgA antitela u placebo grupi (-28%, -38, -20%, srednja vrednost, 90% interval pouzdanosti; $p=0,02$), dok je u suplementiranoj grupi takođe zabeležen pad, ali koji nije dostigao statističku značajnost (-8,7%, -15, 1,7%, $p=0,34$).

Suplementacija probiotikom je dovela do održanja nivoa ukupnih IgA antitela (srednja razlika među grupama: 15% (12 - 18%, $p=0,04$)). Razlika u nivou ukupnih IgG i IgM antitela među grupama nije uočena. Zabeležen je značajan porast IgM antitela u obe grupe: u eksperimentalnoj (18% (15 - 20%), $p=0,02$) i u placebo grupi (35%, 22 - 47%, $p=0,02$). Nije uočena značajna razlika u nivou specifičnih antitela protiv laktobacilusa, ali je uočen značajni pad od 16% (-2,8 - 35%, $p=0,04$) u nivou anti - *Enterococcus faecalis* IgG antitela. Tokom studije nije došlo do promena specifičnih

IgM antitela, kako protiv LAB, tako ni protiv uropatogenih bakterija. Nivoi određenih specifičnih IgA antitela se nisu značajno menjali tokom studije u Lafti® L10 grupi. Međutim, u placebo grupi je uočen značajan pad specifičnih IgA antitela protiv *L. rhamnosus* LA68 i *L. rhamnosus* LB64 u odnosu na interventnu grupu.

Nisu uočene značajne razlike između grupa u nivou interleukina 10 (IL-10), interferona-gama (IFN- γ) i transformišućeg faktora rasta 1 (engl. *transforming growth factor* 1, TGF- β 1). Nivo IL-4 je bio ispod nivoa detekcije u svim analiziranim uzorcima, kako na početku, tako i na kraju studije. Pokazan je značajan efekat vremena na nivo TGF- β 1: $F(1,37)=6,14$, $p=0,030$, $\eta^2=0,178$), ali *post hoc* test nije potvrdio značajnu razliku ni za eksperimentalnu ($p=0,22$), ni za placebo grupu ($p=0,06$). Uočen je značajan porast nivoa IFN- γ u obe grupe ispitanika (značajan efekat interakcije $F(1,37)=62,99$, $p=0,003$, $\eta^2=0,471$ i efekat vremena $F(1,37)=22,35$, $p<0,001$, $\eta^2=0,818$) nakon stimulacije PBMC antigenom ConA, pri čemu *post hoc* test nije ukazao na razliku među grupama.

Nisu zabeležene značajne promene vijabilnosti ćelija nakon stimulacije antigenima konkanavalinom A (ConA) ili lipoglikanom (LPS) tokom studije ni u jednoj grupi.

Suplementacija probiotikom nije značajno uticala na koncentraciju leukocitnih i limfocitnih populacija (CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD45RO+, CD8+CD45RO+, CD19+ i CD11b+ ćelije). Sa druge strane, uočen je značajni efekat interakcije, vremena i grupe za odnos CD4+/CD8+ ćelija. Značajan porast odnosa CD4+/CD8+ ćelija tokom perioda suplementacije uočen je jedino u Lafti® L10 grupi ($p<0,001$).

Analizom parametara oksidativnog statusa, uočeno je povećanje parametara oksidativnog stresa uz smanjenje parametara antioksidativne zaštite kod vrhunskih sportista. Međutim, među ispitivanim grupama nije uočena statistički značajna razlika ni za jedan parametar oksidativnog statusa: totalni oksidativni status (TOS), totalni antioksidativni status (TAS), prooksidativno-antioksidativni balans (PAB), kao i u koncentracijama uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP) i aktivnostima enzima paraoksonaze (PON1) i superoksid-dismutaze (SOD). Malonildialdehid (MDA), kao završni produkt lipidne peroksidacije, na kraju studije je bio značajno smanjen u eksperimentalnoj grupi ($p=0,051$). U obe grupe ispitanika je došlo do značajnog povećanja TAS (značajan efekat vremena: $F(1,30)=61,02$, $p=0,000$, $\eta^2=0,854$). Aktivnost PON1 je značajno snižena na kraju studije (efekat vremena: $F(1,30)=69,06$, $p=0,000$, $\eta^2=0,712$) u obe grupe ispitanika. Konvencionalni biohemijski parametri se nisu menjali tokom studije i nisu uočene značajne razlike među grupama ispitanika.

Analizom upitnika o stanju raspoloženja nije utvrđena značajna razlika u rezultatima koji se tiču skorova za stanje anksioznosti, depresije, borbenosti, konfuznosti, zamora, kao i totalnog osećaja uznemirenosti. Došlo je značajnih promena subjektivnog osećaja snage jedino u suplementiranoj grupi ($p=0,012$).

Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 nije dovela do promene sportskih performansi, tj. maksimalnog aerobnog kapaciteta, kao ni ostalih parametara ergospirometrijskog ispitivanja.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Rezultati ove studije ukazali su da suplementacija probiotskim sojem *L. helveticus* L10 tokom 14 nedelja zimskog perioda dovodi do smanjenja dužine trajanja i broja simptoma infekcija gornjih respiratornih puteva vrhunskih sportista. Pored toga, iako statistička značajnost nije dostignuta, zabeležen je trend smanjenja ozbiljnosti respiratornih simptoma u probiotskoj grupi. Dobijeni rezultati su u skladu sa sličnim studijama izvedenim u populaciji ragbista (Haywood i sar., 2013) i maratonaca (Cox i sar., 2010). Ovi pozitivni klinički ishodi se najverovatnije mogu pripisati imunomodulatornim svojstvima soja *L. helveticus* L10, i to pre svega ojačanju mukoznog i humoralnog imuniteta. Naime, suplementacija sojem *L. helveticus* L10 pomogla je u održavanju nivoa IgA antitela u salivi i serumu, dok su u placebo grupi na kraju studije zabeležene statistički značajno niže koncentracije ovih antitela u odnosu na bazalne vrednosti. Pozitivni efekti probiotika u ojačanju mukoznog imuniteta zabeleženi su u opštoj, ali i u sportskoj populaciji (Tiollier i sar, 2007; Gleeson i sar, 2011). Niske apsolutne koncentracije salivarnih IgA antitela smatraju se značajnim rizikom pojave respiratornih infekcija u sportskoj populaciji (Walsh i sar, 2011).

Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 najverovatnije dovodi do indukcije specifičnog humoralnog imuniteta. Naime, u probiotskoj grupi je došlo do održanja nivoa serumskog IgA antitela dva soja bakterija mlečne kiseline (LAB). Održanje specifičnog IgG antitela protiv *E. faecalis* u probiotskoj grupi dalje ukazuje na sposobnost soja Lafti da indukuje specifični humoralni odgovor. Međutim, nivo specifičnih IgG antitela protiv ostalih ispitivanih urogenitalnih bakterija i LAB je ostao nepromenjen. Slični rezultati o sposobnosti probiotskih sojeva da indukuju specifičan humoralni imunitet su uočeni protiv: *Salmonellae typhi* (Link-Amster et al., 1994), rotavirusa (Isolauri et al., 1995), i polio virusa (de Vrese et al., 2005). Za razliku od indukcije specifičnih IgA i IgG antitela, nije uočena promena IgM ni prema jednoj vrsti od ispitivanih bakterija. Ovi rezultati su očekivani, s obzirom na to da se IgM antitelo prvo sekretuje u imunskom odgovoru i da pokazuje najveći stepen unakrsne reaktivnosti protiv antigena.

Nisu uočene promene u nivou antigenom stimulisanih IFN- γ , što nije u skladu sa prethodno izvedenim kliničkim studijama (Clancy i sar, 2006; van Baarlen i sar, 2011). Naime, suplementacija navedenim sojem tokom 4 nedelje, u dnevnoj dozi od 2×10^{10} CFU povećala je antigenom stimulisanu produkciju IFN- γ (Clancy i sar, 2006). Zatim, suplementacija sojem Lafti tokom 6 nedelja dovela je do ushodne regulacije nekoliko gena povezanih sa delovanjem IFN- γ (van Baarlen i sar, 2011). Najverovatnije

objašnjenje neusaglašenosti u rezultatima je nedostatak direktne metodološke analogije sa navedenim studijama, s obzirom na nedostatak placebo grupe u njihovom dizajnu. Antigenom stimulirani IL-4 nije detektovan ni u jednoj od mernih tačaka, što takođe nije u saglasnosti sa rezultatima prethodne studije (Clancy i sar, 2006), a najverovatnije se može pripisati niskoj osetljivosti korišćenog ELISA kita.

Promene u nivou IL-10 nakon antigenske stimulacije nisu bile značajne ni u jednoj grupi ispitanika, što je u saglasnosti sa ostalim studijama sličnog dizajna (Gleeson, et al, 2011, Gleeson et al, 2012, Cox et al, 2010). Ovaj interleukin je značajan imunološki medijator u etiopatologiji respiratornih infekcija u sportskoj populaciji (Gleeson and Bishop, 2013), s obzirom na to da inhibira Th1 odgovor, kroz supresiju sekrecije IFN- γ i IL-12 (Maynard i Weaver, 2008). Primećeno je da nivo sekrecije IL-10 nakon stimulacije multivalentnom vakcinom značajno korelira sa brojem respiratornih simptoma i njihovom dužinom trajanja (Gleeson i sar., 2012).

Uočeno je povećanje koncentracije TGF- β 1 u serumu u obe grupe, pri čemu je u placebo grupi ono bilo izraženije i blizu dostizanja statističke značajnosti ($p=0,06$). Blago povećanje nivoa TGF- β 1 je zabeleženo nakon akutne FA, što je najverovatnije posledica oštećenja mišića ili tetiva (Heinemeier i sar, 2003).

Ostali parametri celularnog imuniteta (udeo limfocitnih i leukocitnih populacija, metabolička aktivnost/vijabilnost ćelija nakon antigenske stimulacije) nisu značajno izmenjeni tokom studije ni u jednoj grupi, osim odnosa CD4+/CD8+ (*T helper/T suppressor*), koji je porastao u probiotskoj grupi. Odnos CD4+/CD8+ je parametar koji je osetljiv na visoki intenzitet FA i dovodi se u vezu sa akutnim virusnim infekcijama (Chakravarti, 1995). Ovaj nalaz je u skladu sa održanjem nivoa ukupnih i specifičnih anti-LAB IgA i anti-*E. faecalis* IgG antitela u probiotskoj grupi. Pretpostavljamo da značajno povećanje ovog parametra u probiotskoj grupi verovatno doprinosi skraćanju dužine respiratornih infekcija, indukujući brže sazrevanje B ćelija i sekreciju antitela. Slični rezultati su uočeni i kod zdravih dobrovoljaca, kao i kod novorođenčadi (Zhang i sar, 2008) nakon suplementacije sojem *L. casei*.

Tokom studije nisu uočene značajne promene lipidnog statusa i kardiovaskularnog rizika ni u jednoj grupi ispitanika. Nivoi LDL-C i ukupnog holesterola su smanjeni, dok su nivoi HDL-C i TGC blago povećani. Ovakvi rezultati su se generalno mogli očekivati, s obzirom na to da su učesnici studije bili mladi zdravi i aktivni ljudi kod kojih su parametri lipidnog profila u granicama referentnih vrednosti.

Statističkom analizom parametara oksidativnog statusa, nisu utvrđene razlike u ispitivanim grupama tokom perioda studije, osim za MDA, koji je smanjen u interventnoj grupi. Ovi rezultati ukazuju da soj Lafti najverovatnije ne poseduje antioksidativna svojstva. Pored toga, uočen je značajan pad aktivnosti enzima PON1 u obe grupe ispitanika, što nije u saglasnosti sa većim brojem prethodnih studija. Tako, kod odbojkašica dolazi do povećanja aktivnosti PON1 (Martinovic i sar, 2009), dok neke studije pokazuju da FA nema uticaj na aktivnost ovog enzima (Tomas i sar, 2002; Martinovic i sar, 2011). Ipak, bitno je naglasiti da uticaj FA na aktivnost PON1 nije još uvek sasvim razjašnjen, a da se neslaganja u literaturi mogu pripisati različitim

intenzitetu FA ispitanika, dužini trajanja FA, ali pre svega postojanju PON1-192 polimorfizma.

Ipak, koncentracije svih parametara oksidativnog stresa (AOPP, MDA, TOS, PAB) bile su iznad referentnih vrednosti, kako na početku, tako i na kraju studije. Sa druge strane, nivoi antioksidativnih parametara, SOD i TAS, nalazili su se ispod referentnih vrednosti, što je najverovatnije posledica neodgovarajućeg unosa dijetarnih antioksidanasa. Stoga, rezultati ove studije pokazuju da intenzivna FA dovodi do povećanja oksidativnog stresa i ispoljava kumulativne efekte na oksidaciju lipida i proteina, u ovoj specifičnoj grupi sportista. Ovi nalazi su u skladu sa dostupnim literaturnim podacima, koji ukazuju da sportisti često ne unose dovoljno antioksidanasa putem hrane, čime postaju osetljiviji na negativno dejstvo oksidativnog stresa (Margaritis i sar, 2003). Stoga, dobro isplanirana suplementacija antioksidansima bi bila od koristi ovoj grupi sportista, kako bi se smanjio oksidativni stres i ojačali prirodni antioksidantni mehanizmi.

Zanimljiv rezultat ove studije je poboljšanje subjektivnog osećaja snage u probiotskoj grupi. Ovaj nalaz može biti povezan sa ukupnim unapređenjem zdravlja, ali možda predstavlja prvi dokaz da soj *L. helveticus* poseduje sposobnost modulacije tzv. mozak-GIT osovine. S obzirom da je ova studija obuhvatila relativno mali broj ispitanika i da ne postoje drugi dokazi da soj *L. helveticus* L10 vrši modulaciju raspoloženja sportista, ovakvom tumačenju rezultata pristupamo vrlo oprezno. Ipak, postoje studije koje su pokazale pozitivne efekte suplementacije probioticima na raspoloženje (Desbonnet i sar., 2010, Sashihara, i sar, 2013).

Literatura:

Chakravarti, A. (1995). The CD4/CD8 ratio: Message in a bottle?. *Nature Medicine*, 1(12), 1240-1241.

Clancy, R. L., Gleeson, M., Cox, A., et al. (2006). Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon γ secretion after administration of *Lactobacillus acidophilus*. *British Journal of Sports Medicine*, 40(4), 351-354.

Cox, A. J., Pyne, D. B., Saunders, P. U., et al. (2010). Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. *British Journal of Sports Medicine*, 44(4), 222-6.

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., et al. (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, 170(4), 1179–1188.

de Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, et al. (2005) Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clinical Nutrition* 24, 481–491.

- Gleeson, M., Bishop, N. C., Oliveira, M., et al. (2011). Daily probiotic's (Lactobacillus casei Shirota) reduction of infection incidence in athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 21(1), 55-64.
- Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira, M., et al. (2012). Effects of a Lactobacillus salivarius probiotic intervention on infection, cold symptom duration and severity, and mucosal immunity in endurance athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 22(4), 235-242.
- Haywood, B. A., Black, K. E., Baker, D., et al. (2014). Probiotic supplementation reduces the duration and incidence of infections but not severity in elite rugby union players. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 17(4), 356-360.
- Heinemeier, K., Langberg, H., and Kjaer, M. (2003). Exercise-induced changes in circulating levels of transforming growth factor- β -1 in humans: methodological considerations. *European Journal of Applied Physiology*, 90(1-2), 171-177.
- Isolauri, E., Joensuu, J., Suomalainen, H., et al. (1995). Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by Lactobacillus casei GG. *Vaccine*, 13(3), 310-312.
- Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., et al. (1994). Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 10(1), 55-63.
- Margaritis, I., Palazzetti, S., Rousseau, A. S., et al. (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(2), 147-156.
- Martinovic, J., Dopsaj, V., Dopsaj, M. J., et al. (2009). Long-term effects of oxidative stress in volleyball players. *International Journal of Sports Medicine*, 30(12), 851-856.
- Martinovic, J., Dopsaj, V., Kotur-Stevuljevic, J., et al. (2011). Oxidative stress biomarker monitoring in elite women volleyball athletes during a 6-week training period. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 25(5), 1360-1367.
- Maynard C. L. and Weaver C. T. (2008). Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunology Review*, 226, 219-33.
- Sashihara, T., Nagata, M., Mori, T., et al. (2013). Effects of Lactobacillus gasseri OLL2809 and α -lactalbumin on university-student athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 38(12), 1228-1235.

Tiollier, E., Chennaoui, M., Gomez-Merino, D., et al. (2007). Effect of a probiotics supplementation on respiratory infections and immune and hormonal parameters during intense military training. *Military Medicine*, 172(9), 1006-1011.

Tomás, M., Elosua, R., Sentí, M., et al. (2002). Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the effects of regular and acute exercise on paraoxonase1 activity. *Journal of Lipid Research*, 43(5), 713-720.

van Baarlen, P., Wells, J. M., and Kleerebezem, M. (2013). Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology*, 34(5), 208-215.

Walsh, N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., et al. (2011). Position statement part one: immune function and exercise. *Exercise Immunology Review*, 17, 6-63.

Zhang, F. J., Sun, Z. Y., and Cheng, B. L. (2008). Effects of probiotics supplementation on intestinal symptoms and immunity of preterm infants. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 11, 015.

D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Značaj ove doktorske disertacije se ogleda u pružanju novih saznanja iz oblasti sportske ishrane i suplementacije koja je vrlo aktuelna i nedovoljno istražena. Rezultati disertacije obezbeđuju nove dokaze o efikasnosti suplementacije probioticima u ovoj specifičnoj populaciji. Pokazano je da probiotski soj *L. helveticus* L10 pomaže u održavanju mukoznog i humoralnog imuniteta tokom zimskog perioda, što rezultuje skraćenjem trajanja dužine respiratornih infekcija i smanjenjem broja respiratornih simptoma. S obzirom na to da su vrhunski sportisti posebno osetljivi na pojavu infekcija gornjeg respiratornog trakta, ovi rezultati imaju veliki praktičan značaj. Suplementacija sojem *L. helveticus* L10 bi posebno bila od koristi sportistima u periodu intenzivnih priprema i takmičenja, kada je učestalost javljanja respiratornih infekcija najveća.

Disertacija je pružila nova saznanja o potencijalnim antioksidativnim svojstvima probiotika. Iako određene kliničke studije ukazuju na sposobnost probiotika da smanje oksidativni stres u sportskoj populaciji, rezultati ove disertacije nisu potvrdili antioksidativne osobine soja *L. helveticus* L10. Pokazano je da vrhunski sportisti usled nedovoljnog unosa dijetarnih antioksidanasa imaju povećane nivoe parametara oksidativnog stresa uz smanjene vrednosti parametara antioksidativne zaštite. Ovo ukazuje na važnost optimalno balansirane ishrane i dijetarnih intervencija u populaciji vrhunskih sportista.

E. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Naučni radovi:

- Michalickova, D., Minic, R., Dikic, N., Andjelkovic, M., Kostic-Vucicevic, M., Stojmenovic, T., Nikolic, I., Djordjevic, B. (2016). Lactobacillus helveticus Lafti L10 supplementation reduces respiratory infection duration in a cohort of elite athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 41(7), 782-789. (M21)
- Michalickova, D. M., Kostic-Vucicevic, M. M., Vukasinovic-Vesic, M. D., Stojmenovic, T. B., Dikic, N. V., Andjelkovic, M. S., Djordjevic, B. I., Tanaskovic, B. P., and Minic, R. D. (2017). Lactobacillus helveticus Lafti L10 Supplementation Modulates Mucosal and Humoral Immunity in Elite Athletes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 31(1), 62-70. (M22)

Saopštenja na skupovima međunarodnog značaja:

- Marinkovic D., Minic R., Dikic N., Andjelkovic M., Vukasinovic-Vesic M., Stojmenovic T., Kostic M., Nikolic I., Djordjevic B. The effect of Lactobacillus helveticus L10 supplementation on respiratory infections and mucosal immunity in elite athletes. Book of Abstracts, 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for microbiota and human health. Rome, Italia, 13-15. September, 2015.
- Djordjevic B and Marinkovic D. Nutrition and supplementation in athletes. 3rd Congress of pharmacists' of Bosnia and Herzegovina with international participation. Sarajevo, Bosna and Herzegovina, Pharmacia 2015; 18:(1) supl. 1
- Djordjevic, B., Marinkovic, D., Minic, R., Ivanovic, N., Dikic, N., Andjelkovic, M., Zivkovic I, Stankovic, I. (2016). Lactobacillus Helveticus L10 Supplementation Modulates Immunity Parameters in Elite Athletes: Medicine and science in sports and exercise, 48(5 Suppl 1), 246.

F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Pregledom završene doktorske disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u naučnim časopisima međunarodnog značaja. Na osnovu izloženog, može se zaključiti da rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pružaju originalan i značajan naučni doprinos u oblasti suplementacije probiotskim kulturama mikroorganizama u sportskoj populaciji.

Uzimajući u obzir sve što je izloženo, predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji kandidata magistra farmacije Danice Michaličkove (rođ. Marinković) i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Uticaj suplementacije sojem *Lactobacillus helveticus* L10 na markere imunološkog i oksidativnog statusa vrhunskih sportista“.

Komisija u sastavu:

Dr sc. Brižita Đorđević, redovni profesor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Rajna Minić, viši naučni saradnik
Odsek za naučno-istraživački rad, Institut za virusologiju, vakcine i serume,
Torlak

Dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević, vanredni profesor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Nataša Golić, naučni savetnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Bojana Vidović, docent
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

U Beogradu,
10.2.2017.