

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

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.04.2019. године, прихваћен је извештај ментора др Катарине Вељовић и др Бранка Јовчића, о урађеној докторској дисертацији Николе Д. Поповића, истраживача сарадника на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду, под насловом: **“Испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика природних изолата ентерокока у моделима *in vitro* и *in vivo*”** и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Катарина Вељовић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, ментор; др Бранко Јовчић, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, ментор и др Јелена Ђокић, научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Николе Д. Поповића под насловом **“Испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика природних изолата ентерокока у моделима *in vitro* и *in vivo*”** представља оригинално истраживање које за тему има проучавање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика ентерокока из млека и ферментисаних млечних производа са подручја Западног Балкана у моделима *in vitro* и *in vivo*.

Ова докторска дисертација је урађена у Лабораторији за молекуларну микробиологију Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, у оквиру пројекта "Изучавање гена и молекуларних механизма у основи пробиотичке активности бактерија млечне киселине изолованих са подручја Западног Балкана (ОИ 173019)".

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима, Списак литературе и Прилоге. Докторска дисертација написана је на 160 страница (проред 1,5), садржи 28 слика и 14 табела. Дисертација је подељена на 8 поглавља: **Увод** (1-27 страна), **Циљеви рада** (28 страна), **Материјал и методе** (29-53 страна), **Резултати** (54-82 страна), **Дискусија** (83-96 страна), **Закључци** (97-101 страна), **Списак литературе** (102-132 страна) и **Прилози** (133-160). Поред наведеног у прилогу садржи: Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације, Изјаву о коришћењу, као и научне радове објављене у научним часописима са ISI листе који су директно проистекли из докторске дисертације.

2. АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи шест потпоглавља. У њему су сажето приказани литературни подаци који су непосредно повезани са темом докторске дисертације.

У потпоглављу „Род *Enterococcus*“ описане су основне морфолошке, биохемијске, физиолошке и генетичке карактеристике овог рода, диверзитет станишта, њихова улога у ферментисаним млечним производима и улога у изазивању болничких инфекција. Поред тога, дат је преглед филогенетске сродности и претпостављене старости овог рода на основу филогенетске анализе гена за 16S рибозомалну РНК, као и историјат класификације ентерокока. У оквиру „Идентификација ентерокока“ дат је преглед конвенционалних метода које су се користиле за идентификацију ентерокока и које су базиране на физиолошким карактеристикама овог рода, затим преглед молекуларних метода којима се анализирају различити конзервисани гени приликом идентификације ентерокока, као и најсавременијих метода за њихову исправну идентификацију до нивоа врсте. У потпоглављу „Ентерококе као патогени“ су описани

фактори који доприносе патогености ентерокока, као што су резистенција на антибиотике, присуство детерминанти вируленције и формирање биофилма. У одељку „Резистенција ентерокока на антибиотике“ описане су урођене и стечене отпорности на широки спектар антибиотика као што су: β -лактамски антибиотици, гликопептиди, аминогликозиди, хинолони, линезолид, тетрациклин, еритромицин, хлорамфеникол, нитрофурантоин и рифампицин. У оквиру одељка „Вирулентне детерминанте ентерокока“ описани су адхезини ентерокока који им омогућавају да се вежу за протеине ванћелијског матрикса и да на тај начин фаворизују колонизацију епитела. Фактори вируленције који доприносе колонизацији описани у овом одељку су: агрегациона супстанца, колаген везујући протеин, антиген специфичан за ендокардитис и ентерококални површински протеин, као и токсичне супстанце које имају деструктивни ефекат на ткиво домаћина: цитолизин, желатиназа и хијалуронидаза. Одељак „Ентерококе и формирање биофилма“ описује фазе формирања биофилма код ентерокока, као и факторе животне средине и протеине на површини ћелије који су укључени у формирање биофилма. У потпоглављу „Ентерококе као пробиотици“, у посебним одељцима, детаљно је дат преглед досадашњих литературних података о основним механизмима којима ентерококе остварују пробиотички ефекат на домаћина као и критеријуми за одабир пробиотика. У оквиру овог потпоглавља описани су бактериоцини ентерокока, њихова класификација и механизми посредством којих производња бактериоцина може допринети пробиотичкој активности. Поред тога, у одељцима „Утицај ентерокока на епителну баријеру“ и „Конкурентно искључивање патогених бактерија“ описани су механизми посредством којих ентерококе спречавају или ограничавају раст других бактерија и утичу на епителну баријеру. У одељцима „Модулација имунског одговора посредована пробиотичким бактеријама“ и „Препознавање ентерокока преко TLR домаћина“ описани су специфични и неспецифични механизми деловања ентерокока на домаћина, интеракција молекула експримираних на површини ћелије ентерокока и рецептора на ћелијама домаћина. Додатно, стављен је акценат на пептидогликан и теихоичну киселину ентерокока и механизам модулације имунског одговора посредован овим молекулима. У потпоглављу „*Listeria monocytogenes* као модел испитивања инфекције“ описан је механизам инфекције овог патогена као и активација антибактеријског одговора домаћина преко TLR рецептора. У оквиру потпоглавља „Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис као модел испитивања аутоимунских болести“

описан је најчешће коришћен модел мултипле склерозе, учесталост ове болести у свету као и механизми настанка овог обољења.

У поглављу **Циљеви рада** јасно су дефинисани главни научни циљеви докторске дисертације. Они су подељени у три групе циљева. У првој групи циљева дефинисани су циљеви везани за испитивање безбедносног статуса ентерокока изолованих из ферментисаних млечних производа са подручја Западног Балкана. Истраживања везана за овај циљ су обухватила: 1. Испитивање хемолитичке и желатиназне активности; 2. Испитивање осетљивости на антибиотике; 3. Испитивање присуства фактора вируленције; и 4. Испитивање формирања биофилма. У другој групи циљева дефинисани су циљеви везани за испитивање пробиотичких својстава одабраних сојева ентерокока у моделима *in vitro*. Истраживања везана за овај циљ су обухватила: 1. Преживљавање симулираних услова гастроинтестиналног тракта; 2. Везивање за муцин, колаген и фибронектин; 3. Везивање за НТ29-МТХ ћелијску линију; 4. Антимикробни потенцијал; 5. Ефекат на интестиналне ћелије; и 6. Ефекат на моделу инфекције са *Listeria monocytogenes*. У трећој групи циљева дефинисани су циљеви везани за испитивање имуномодулаторног потенцијала одабраног соја на моделу *in vitro* и *in vivo*. Истраживања везана за овај циљ су обухватила: 1. Модулацију функције мезентеричних лимфних чворова *in vitro*; и 2. Ефекат на инфламацијске болести *in vivo*.

У поглављу **Материјал и методе** описане су савремене методе молекуларне микробиологије коришћене у реализацији наведених циљева. У оквиру потпоглавља су описани бактеријски изолати, као и детаљни методолошки поступци коришћени у њиховој карактеризацији у овој тези. У потпоглављу „Бактеријски сојеви“ су дати списак и подаци о сојевима који су изучавани у овој тези (регион и порекло), као и списак коришћених индикаторских сојева. У потпоглављу „Медијуми за култивацију бактерија“ су описани медијуми у којима су гајене бактерије као и услови у којима су расле (температура и аерација). Бактеријски екстракти коришћени у овом истраживању за испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика описани су у „Припрема бактеријских екстраката“. Поступци за изолацију укупне ДНК из бактеријских ћелија, као и изоловање плазмидне ДНК из *Escherichia coli* DH5 α описане су у потпоглављима „Изолација укупне ДНК из ентерокока“ и „Изолација плазмидне ДНК из *Escherichia coli* DH5 α “. Умножавање циљних ДНК фрагмената методом ланчане реакције полимеразе („Polymerase Chain Reaction“, PCR) као и списак прајмера су описани у потпоглављу „Ланчана реакција полимеразе „PCR““. Визуелизација

тоталне бактеријске ДНК и ДНК фрагмената добијених PCR методом је вршена хоризонталном гел електрофорезом описаном у потпоглављу „Хоризонтална гел електрофореза ДНК“.

Методe испитивања безбедносног статуса ентерокока као живих микроорганизама и њихове потенцијалне употребе у биомедицини и ветерини описане су у оквиру „Испитивање безбедносног статуса ентерокока“. У овој групи описане су методе „Тест хемолитичке активности“, „Тест желатиназне активности“, „Тест микродилуције“ и „Тест формирања биофилма“. Методе испитивања пробиотичких особина описане су у групи метода „Методe процене пробиотичких карактеристика ентерокока“ и садрже: „Тест преживљавања ентерокока у симулираним условима гастроинтестиналног тракта“, „Тест везивања ентерокока за имобилисани муцин, колаген и фибронектин“, „Култивација НТ29-МТХ ћелијске линије“ и „Тест везивања ентерокока за НТ29-МТХ“. У оквиру „Методe пробиотичке карактеризације *Enterococcus faecium* ВGPAS1-3“ описани су тестови „Тест антимикуробног деловања *Enterococcus faecium* ВGPAS1-3“ и „Одређивање броја *Listeria monocytogenes* АТСС19111 ћелија у моделу производње јогурта са додатком живог и топлотом убијеног *En. faecium* ВGPAS1-3“. Додатно, да би се испитао пробиотички ефекат *Enterococcus faecium* ВGPAS1-3 коришћена је Сасо-2 ћелијска линија и за потребе ових експеримената Сасо-2 ћелије су диференциране и урађени су „Тестови адхезије и инвазије *Listeria monocytogenes* АТСС19111 на диференцираним Сасо-2 ћелијама у комбинацији са живим и топлотом убијеним *Enterococcus faecium* ВGPAS1-3“. Ефекат живог и топлотом убијеног *Enterococcus faecium* ВGPAS1-3 на диференцираним Сасо-2 ћелијама у моделу инфекције праћен је тестовима: „Изоловање укупне RNK из Сасо-2 ћелија“, „Реакција реверзне транскрипције“, „Квантитативна реакција ланчаног умножавања у реалном времену „qPCR“ “ и „Метода Western blot“. Да би се испитао имуномодулаторни ефекат топлотом убијеног *Enterococcus faecium* ВGPAS1-3, спроведена су *in vitro* и *in vivo* истраживања. У оквиру „Методe испитивања имуномодулаторног потенцијала топлотом убијеног *Enterococcus faecium* ВGPAS1-3 *in vitro*“ коришћени су мужјаци пацова Wistar соја узгајани на фарми Војномедицинске академије у Београду. Све експерименталне процедуре одобрене су од стране Етичке комисије Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије (број дозволе 119-01-5/14/2017-09) и наведене су у „Експерименталне животиње“. Изоловање ћелија мезентеричних лимфних чворова (МЛЧ) из Wistar пацова и успостављање примарне ћелијске културе описани су у оквиру „Изоловање ћелија

мезентеричних лимфних чворова и успостављање примарне ћелијске линије“. Цитотоксични ефекат и ефекат топлотом убијеног BGPAS1-3, пептидогликана BGPAS1-3 и пептидогликана без теихоичне киселине BGPAS1-3 на метаболичку активност ћелија МЛЧ стимулираних са конканавалином А (Кона) (модел *in vitro* инфламације) одређен је тестом LDH („Lactate dehydrogenase“) и МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолијум бромид), редом у тестовима „Мерење цитотоксичности третмана тестом LDH“ и „Мерење метаболичке активности тестом МТТ“. Ефекти топлотом убијеног BGPAS1-3, пептидогликана BGPAS1-3 и пептидогликана без теихоичне киселине BGPAS1-3 на способност ћелија МЛЧ стимулираних са Кона за продукцију цитокина (IL-10, IFN- γ и IL-17) одређен је тестом ELISA и описан у тесту „Мерење продукције цитокина тестом ELISA“. За испитивање ефекта топлотом убијеног BGPAS1-3 у *in vivo* моделу коришћени су Dark Agouti пацови којима је индукован експериментални аутоимунски енцефаломијелитис и методе су описане у „Имунизација животиња“. Све експерименталне процедуре одобрене су од стране Етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду (број дозволе 03-10/15) и наведене су у „Експерименталне животиње“. Животиње су третиране топлотом убијеним *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 на начин који је описан у „Примена топлотом убијеног *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 на Dark Agouti пацовима *in vivo*“. Ефекат топлотом убијеног *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 на клинички ток болести описан је у „Евалуација клиничке слике експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“. Поред тога, ефекат топлотом убијеног *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 на микробиом имунизованих женки Dark Agouti пацова описан је у „Електрофореза у градијенту денатуришућег агенса (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE анализа)“. У последњем потпоглављу „Статистичка обрада резултата“ су истакнути програми и тестови коришћени за обраду резултата добијених у овој тези.

У поглављу **Резултати** су приказани резултати истраживања добијени у овој тези. Ово поглавље је организовано у три дела: испитивање безбедносног статуса ентерокока изолованих са подручја Западног Балкана, испитивање пробиотичких карактеристика одабраних сојева у моделу *in vitro*, испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 у моделима *in vitro* и *in vivo*. Изолати који су коришћени у овој студији (n = 75) су у претходним студијама окарактерисани као сензитивни и интермедијерно резистентни на антибиотике према методи диск дифузије. Изоловани су из руралних предела

Републике Србије, Републике Хрватске и Босне и Херцеговине из млека, кајмака, милерама и сирева од некуваног крављег и козијег млека. На почетку истраживања у оквиру докторске тезе умножавањем гена за 16S рРНК и поређењем резултата након секвенцирања идентификовани су ови изолати и показано је да 50 сојева припада врсти *En. durans*, 15 сојева врсти *En. faecium*, 6 врсти *En. faecalis*, 3 соја врсти *En. italicus* и један сој припада врсти *En. hirae*. Током испитивања безбедносног статуса ентерокока показано је да 14 испитиваних ентерокока има алфа хемолитичку активност, док 5 испитиваних ентерокока има желатиназну активност. У наставку студије, за 56 сојева који нису показали хемолитичку и желатиназну активност, је испитана осетљивост на антибиотике и показана је висока учесталост резистенције на ципрофлоксацин (n = 27), док су у мањој мери тестирани сојеви резистентни на гентамицин (n = 6). У наставку истраживања испитивана су 23 соја који не поседују резистенцију на антибиотике. Испитивањем способности формирања биофилма показано је да 9 сојева нема могућност да формира биофилм, док је 14 сојева показало различит степен формирања биофилма (11 сојева поседује слабу способност формирања биофилма, један сој има јаку способност формирања биофилма и два соја су показала веома јаку способност формирања биофилма). На основу резултата присуства гена који кодирају различите факторе вируленције у геному испитиваних ентерокока, може се уочити висока заступљеност гена који кодирају адхезине, док је присуство гена чији су протеински производи одговорни за формирање биофилма су спорадично присутни. За испитивање пробиотичких особина одабрана су 23 соја који немају хемолитичку и желатиназну активност и који су осетљиви на десет клинички релевантних антибиотика. Међу одабраним сојевима, изабрани су и сојеви који имају способност формирања биофилма и присутне гене чији су протеински производи одговорни за колонизацију домаћина. Као критеријуми за селекцију пробиотика испитивани су: способност бактерија да преживе неповољне услове гастроинтестиналног тракта (ГИТ), да се вежу за муцин, протеине ванћелијског матрикса и интестиналне ћелије и продукција антимикуробних једињења. Преживљавање 23 анализирана соја у ГИТ након инкубације у желудачном соку је у просеку 94,4% - 98,8% ± 1,3%, након дванаестопалачног сока 87,1% - 97,9% ± 2,9%, док је у просеку преживљавање цревног сока износило 82,7% - 92,9% ± 3,0% у односу на почетни број бактерија. Описан је висок проценат везивања тестираних ентерокока за муцин, колаген и фибронектин. Тестиране ентерококе се везују за НТ29-МТХ у просеку 86,7% ± 5,4%. Десет тестираних сојева је имало антимикуробно дејство на *En. faecalis* BG221, док су *En. faecium* BGPAS1-3 и BGZLM1-5 имали антимикуробно

дејство на *L. monocytogenes* ATCC19111. Због антилистеријског ефекта и одсуства способности формирања биофилма у другом делу истраживања одабран је *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 за даљу пробиотичку карактеризацију у моделима *in vitro*. Показано је да *En. faecium* BGPAS1-3 продукује термостабилно антимикумно једињење протеинске природе, везано за ћелију. Поред антимикумног деловања на BG221 и ATCC19111, овај сој има антимикумну активност и према *Bacillus subtilis* 168, *Acinetobacter baumannii* 6077/12, *Chromobacterium violaceum* CV026, *Erwinia carotovora* и *Klebsiella pneumoniae* Ni9. Антилистеријски ефекат живог и топлотом убијеног BGPAS1-3 тестиран је у моделу производње јогурта са *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36 и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21 и уочено је смањење броја *L. monocytogenes* ATCC19111 током седам дана складиштења. Поред овог теста, тестиран је ефекат живог и топлотом убијеног BGPAS1-3 на способност везивања и инвазије *L. monocytogenes* ATCC19111 на Сасо-2 ћелијској линији и показано је да, у три типа теста, жив и топлотом убијени BGPAS1-3 смањују везивање *L. monocytogenes* ATCC19111, док не смањују инвазију *L. monocytogenes* ATCC19111 у Сасо-2 ћелијама. Третман диференцираних Сасо-2 ћелија са живим и топлотом убијеним BGPAS1-3 стимулише експресију клаудина на нивоу иРНК и експресије протеина. Ниво експресије *IL-8* иРНК након третмана је смањен, док је ниво *TGF- β* иРНК био повећан. Додатно, жив BGPAS1-3 повећао је експресију *TLR4* иРНК, док је топлотом убијени BGPAS1-3 повећао *TLR2* иРНК. Третмани живим и топлотом убијеним BGPAS1-3 повећали су ниво *MyD88* иРНК, што је све указало на то да је ефекат BGPAS1-3 на Сасо-2 посредован *TLR/MyD88*. Током инфекције Сасо-2 ћелија са *L. monocytogenes* ATCC19111 смањена је експресија клаудина и на нивоу иРНК и на нивоу протеина, као и иРНК за *TGF- β* и *TLR4*, док је ниво *IL-8* и *TLR2* иРНК био повећан. Даље је показано да током инфекције са *L. monocytogenes* ATCC19111 различити третмани живим и топлотом убијеним BGPAS1-3 омогућавају да ниво експресије клаудина и на нивоу иРНК и протеина остане непромењен, или чак повећан у тесту замене и тесту искључења са топлотом убијеним BGPAS1-3. Ниво експресије *IL-8* иРНК био је повећан након инфекције, док су различити третмани живим или топлотом убијеним BGPAS1-3 смањили ниво експресије *IL-8* иРНК, изузев у тесту замене где је остао непромењен у односу на експресију у присуству саме *L. monocytogenes* ATCC19111. Инфекција диференцираних Сасо-2 *L. monocytogenes* ATCC19111 довела је до смањења нивоа експресије *TGF- β* иРНК док топлотом убијени BGPAS1-3 у тесту замене и тесту искључивања омогућава да се ниво експресије *TGF- β*

иРНК одржи на нивоу експресије овог молекула код неинфицираних Сасо-2 ћелија. У тесту искључивања када су Сасо-2 третиране са живим или топлотом убијеним ВGPAS1-3 експресија *TGF-β* иРНК значајно је већа и од нивоа експресије у неинфицираним Сасо-2 ћелијама. Инфекција стимулише експресију *TLR2* иРНК, док је након третмана инфицираних Сасо-2 са живим и топлотом убијеним ВGPAS1-3 ниво *TLR2* иРНК био смањен, изузев у тесту замене са топлотом убијеним ВGPAS1-3 када је ниво експресије иРНК остао непромењен у односу на неинфициране Сасо-2 ћелије. С друге стране, инфекција Сасо-2 ћелија са *L. monocytogenes* ATCC19111 доводи до смањења експресије *TLR4* иРНК, док је експресија иРНК за овај рецептор повећана у Сасо-2 ћелијама третираним са живим ВGPAS1-3 у тесту замене или топлотом убијеним ВGPAS1-3 у тесту искључивања. Ниво експресије *MyD88* иРНК остао је непромењен у Сасо-2 ћелијама након инфекције са *L. monocytogenes* ATCC19111, док до повећања експресије иРНК доводи топлотом убијени ВGPAS1-3 у тесту замене и у тесту искључивања.

На основу претпоставке да топлотом убијени сој делимично задржава молекулске образце повезане са микроорганизмима карактеристичне за живи сој, додатно је испитан имуномодулаторни профил топлотом убијеног соја у моделима *in vitro* и *in vivo*. У овим испитивањима коришћене су ћелије мезентеричних лимфних чворова које су третиране са конканавалином А (КонаА) као *in vitro* модел инфламације. На почетку је показано да топлотом убијени ВGPAS1-3, пептидогликан ВGPAS1-3 и пептидогликан без теихоичне киселине ВGPAS1-3 у односу 1:10 (еукариотска ћелија : прокариотска ћелија) не мењају метаболичку активност и нису цитотоксичне. Такође ови третмани не мењају продукцију про-инфламацијских цитокина IFN- γ и IL-17 у односу на нетретиране КонаА-стимулисане МЛЧ ћелије. Третмани топлотом убијеним ВGPAS1-3, пептидогликаном ВGPAS1-3 и пептидогликаном без теихоичне киселине ВGPAS1-3 повећавају продукцију анти-инфламацијског цитокина IL-10 у односу на нетретиране КонаА-стимулисане МЛЧ ћелије. Топлотом убијени ВGPAS1-3 примењен *in vivo* у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса показао је ефекат на ублажавање симптома у почетним фазама болести као и на врхунцу развоја болести. Додатно је анализом микробиома животиња којима је индукован експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (контролна група животиња) и животиња којима је индукована болест и третиране су топлотом убијеним ВGPAS1-3 уочена разлика у саставу микробиома. Показано је да је *Lactobacillus intestinalis* присутан само на почетку третмана док није детектован 30 дан након имунизације ни у

контролној групи нити у групи која је пила топлотом убијени BGPAS1-3. *Lb. murinus* и *En. hirae* су присутне само у узорцима фецеса имунизованих животиња које су 30 дана третиране топлотом убијеним BGPAS1-3, а нису присутне у контролној групи. Коришћењем универзалних прајмера показано је да се *Shuttleworthia satelles* и *Muribaculum intestinale* појављују само 30. дан у фецесима контролних животиња. Анализом секвенци добијених умножавањем прајмерима специфичним за род *Bifidobacteria* показано је присуство *Bifidobacterium pseudolongum* само у фецесима контролних и третираних животиња 30 дана након имунизације.

Поглавље **Дискусија** је посвећено упоредној анализи резултата добијених у овој тези и података из досадашње научне литературе. У овом поглављу је истакнут значај и допринос добијених резултата како у области микробиологије, тако и у области фундаменталне молекуларне микробиологије. Први део поглавља Дискусија се односи на вирулентни потенцијал ентерокока у коме су детаљно описани и продискутовани резултати добијени у овом истраживању у односу на податке из литературе. Показано је да ентерококе из млека и ферментисаних млечних производа изолованих из руралних делова Западног Балкана имају низак патогени потенцијал. У другом делу поглавља Дискусија је истакнут пробиотички потенцијал ентерокока. Поређењем резултата добијених током овог испитивања са подацима пореклом из досадашње научне литературе може се закључити да испитиване ентерококе имају добар пробиотички потенцијал. Додатно је показано да жив и топлотом убијен *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 испољава антилистеријски ефекат и истовремено омогућава развој ефикасног имунског одговора домаћина против *Listeria monocytogenes* и подстиче продукцију молекула који доприносе заштити интестиналне епителне баријере. Такође је показано да топлотом убијени BGPAS1-3 испољава терапијски ефекат у *in vivo* моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.

У поглављу **Закључци** су изнети закључци који се могу извести из резултата добијених у овој тези. Изнето је 21 појединачних закључака који се односе на испитивање безбедносног статуса ентерокока, испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика ентерокока у моделима *in vitro* и *in vivo*.

У поглављу **Литература** је дата листа 284 извора литературе. Цитирани литературни извори су актуелни и омогућили су развој идеје за извођење овог истраживања, као и објашњење добијених резултата и доношење закључака. Наведени извори покривају све појединачне области овог истраживања и адекватно су наведени у самом тексту.

3. БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. **M21 Popović, N.**, Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., Djokić, J., Golić, N. and Veljović, K. (2018). New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Frontiers in microbiology*, 9, 78.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5797593/>
2. **M21 Popovic, N.**, Djokic, J., Brdaric, E., Dinic, M., Terzić-Vidojević, A., Golic, N., and Veljovic, K. (2019). The influence of heat-killed *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 on the tight junction protein expression and immune function in differentiated Caco-2 cells infected with *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. *Frontiers in Microbiology*, 10, 412.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6411766/>

Конгресна саопштења из докторске дисертације:

1. Veljović, K., **Popović, N.**, Terzić-Vidojević, A., Tolinački, M., Soković, S., Kojić, M., Golić, N. (2015). Safety use of dairy enterococci as probiotic candidates. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld2015, Barcelona, Spain, October 27-30th, Book of Abstracts p. 180.
2. **Popović, N.**, Jovanović, P., Đokić, J., Brdarić, E., Terzić-Vidojević, A., Golić, N., and Veljović, K. (2018). Probiotic potential and immunomodulatory effect of *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 isolated from artisanal cheese. 1st International Conference on Microbial Food and Feed Ingredients, Copenhagen, Denmark. p. 62.

4. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Николе Д. Поповића под насловом: **“Испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика природних изолата ентерокока у моделима *in vitro* и *in vivo*”** представља оригиналан научни рад који се бави испитивањем пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика ентерокока изолованих са подручја Западног Балкана. Резултати овог истраживања допринели су бољем разумевању контроверзне групе млечнокиселинских бактерија и њиховој потенцијалној употреби у медицини и ветерини. Тезу одликују јасно дефинисани циљеви и адекватно планирани и успешно реализовани истраживачки поступак. Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Теза је прошла софтверску проверу оригиналности.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације кандидата Николе Д. Поповића и омогући кандидату јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

др Катарина Вељовић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, ментор

др Бранко Јовчић, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, ментор

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

У Београду, 22.04.2019. године