

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ

ФАКУЛТЕТ:МЕДИЦИНСКИ



ИЗВЈЕШТАЈ

о оцјени урађене докторске дисертације

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

На основу члана 149. Закона о високом образовању Републике Српске („Службени гласник Републике Српске“ број: 73/10, 104/11, 84/12, 108/13, 44/15 и 90/16) члана 54. Статута Универзитета у Бањој Луци и члана 18. Статута Медицинског факултета, Наставно-научно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци на IV редовној сједници одржаној дана, 14.3.2017. год, донијело је одлуку под бројем 18/3 227/2017 о именовању комисије за оцјену и одбрану урађене докторске тезе мр сц Наташе Стојаковић, доктора медицине, по називом: „Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обольелих од инфламаторне болести цријева“ у саставу:

1. Др Свјетлана Стојасављевић Шатара, редовни професор, ужа научна област Фармакологија, Медицински факултет Бања Лука, Универзитета у Бањој Луци, предсједник
2. Др Момир Миков, редовни професор, ужа научна област Фармакологија, Медицински факултет Нови Сад, Универзитета у Новом Саду, ментор и члан
3. Др Стеван Трбојевић, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Фоча, Универзитет у Источном Сарајеву, члан

Након детаљног прегледа урађене докторске тезе кандидата мр сц Наташе Стојаковић, именована комисија Наставно-научном вијећу Медицинског факултета у Бањој Луци подноси следећи извјештај:

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Наташа (Петра) Стојаковић
2. 19.08.1971. Бач, Република Србија
3. Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет Постдипломски студиј, стечено звање магистра медицинских наука.
4. Медицински факултет Бања Лука, магистарска теза под именом „Утицај аеробне цријевне флоре пацова на метаболизам сулфасалазина“ ужа научна област Фармакологије, 29.6. 2006. године.
5. Научна област Фармакологија

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације мр сц. Наташе Стојаковић је :

“Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обольелих од инфламаторне болести цријева”.

Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Наставно-научног вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци Одлуком , број 18-3-233/2012 од 19.3.2012. Сенат Универзитета у Бањалуци Одлуком број: 02/04-3.927-20/12 од 12.4.2012, дао је сагласност на Извештај о оцјени услова и подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације на Медицинском факултету у Бањалуци, кандидаткиње мр сц. Наташе Стојаковић под називом “Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обольелих од инфламаторне болести цријева”.

Садржај докторске дисертације је изложен у следећим поглављима:

1. Увод докторске дисертације је написан на 29 страна.
2. Хипотезе су написане на 1 страни
3. Циљеви истраживања су написани на 1 страни
4. Поглавље Испитаници и методе је написано на 9 страна.
5. Резултати рада су приказани на 81 страници.
6. Дискусија је написана на 10 страна.
7. Закључци су написани на 3 стране.
8. Списак коришћене литературе је написан на 18 страна.

Докторска дисертација кандидатар мр сци Наташе Стојаковић је написана латиничним писмом фонтом *Times New Roman* на 203 стране, формата A4. На почетку дисертације налази се 17 страна које нису нумерисане, а односе се на наслов дисертације, клључне дисертацијске информације (на српском и енглеском језику), захвалницу, садржај, сажетак (на српском и енглеском језику) и листу скраћеница. Садржи 3 слике, 25 графика, 84 табеле и 94 прилога (прилоги садрже табеле које нису приказане у поглављу Резултати рада и приказани су на 50 страна).

У дисертацији су цитирана 202 литературна извора.

У **првој цјелини** (стр. 1-29) истакнут је разлог због којег је ово истраживање предузето као и то да у данашњој, релевантној, научној литератури не постоје свеобухватна испитивања значаја цријевне микрофлоре за метаболизам лијекова и других ксенобиотика код људи. Уводни дио са прегледом литературе јасно даје увид у тренутна научна сазнања везана за бактеријску флору цријева и њену

ензимску активност, механизме настанка инфламаторне болести цијева, примјену пробиотика и њихов утицај на метаболизам лијекова.

У другој цјелини (стр. 30) представљене су хипотезе спроведног истраживања које истичу могућност да краткотрајна или дуготрајна перорална примјена пробиотика утиче на састав и ензимску активност цијевне микрофлоре повећавајући обим разградње сулфасалазина у цијевима и настанак његових метаболита.

Циљеви истраживања су дати у **трећој цјелини** (стр. 30). Циљеви истраживања су прецизно постављени како би се испитао утицај краткотрајне и дуготрајне пероралне примјене пробиотика на састав и ензимску активност цијевне микрофлоре, као и утицај на обим разградње сулфасалазина у цијевима и настанак његових метаболита.

У четвртој цјелини (стр. 31-39) представљена је основна методологија истраживања. У оквиру овог дијела је описан критеријум одабира одговарајућих испитаника (фактори укључивања, искључивања и не укључивања), кориштени лијекови и детаљна методологија рада током истраживања.

Резултати истраживања и тестирање хипотезе чине садржај **пете цјелине** (стр 40-121). У оквиру овог дијела дисертације, систематично су приказани резултати по фазама истраживања. Детаљно су приказани резултати који указују на: 1. промјену броја бактерија у фецесу и мукусу цијева 2. промјену ензимске активност азоредуктазе, нитроредуктазе, бета-глукозидазе и бета-глукуронидазе 3. обим метаболичке измјене сулфасалазина при *in vitro* условима, 4. обим метаболичке измјене сулфасалазина *in vivo*, 5. детекцију пробиотика у узорку фецеса.

Шеста цјелина (стр. 122-131) је представљена дискусијом о добијеним резултатима истарживања и њиховим поређењем са већ постојећим сличним истраживањима у овој научној области. Представљени су и образложени научни и прагматични доприноси овог рада у фармакологији.

У седмој цјелини (стр .132-134) кандидаткиња је на јасан и систематичан начин представила синтезу сазнања и научних чињеница изнесених у оквиру дисертације, добијених на основу резултата истраживања и тестирања хипотезе.

Осма цјелина (стр.135-152) ове дисертације представља списак кориштене литературе у оквиру спроведеног истраживања, а у оквиру израде ове дисертације.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

IV 1. Разлог због којег је истраживање предузето, проблем, предмет, циљеви и

хипотеза истраживања

Људска цијева садрже комплексан екосиситем разних микроорганизама. У истраживањима на животињама је доказан значај цијевне микрофлоре за метаболизам лијекова и других ксенобиотика, али резултати ових истраживања се не могу директно пренијети на људе. Иако је могуће постићи ензимску активност цијевне флоре у животиња сличну оној код људи, једина права информација о улози цијевне микрофлоре код људи се може постићи провођењем добро организованих клиничких испитивања. Модификацијом цијевне флоре помоћу пробиотика се покушава постићи повољно дејство за људе. Иако постоје тврдње о користи пробиотика, не само у превенцији него и у терапији различитих болести, не постоје још увијек јасни докази њиховог дјеловања, било самостално или у интеракцији са лијековима који се користе у терапији. Један од лијекова који се користи у терапији инфламаторне болести цијева, сулфасалазин, представља веома добар модел за испитивање интеракција на нивоу цијевне микрофлоре. Кандидаткиња је кроз рад успешно дала одговор на постављени *проблем истраживања* који се односи на могућност измјене састава цијевне флоре и посљедичног утицаја на метаболизам сулфасалазина.

Кандидаткиња је у дисертацији аргументовано и објективно анализирала *предмет истраживања-утицај* перорално примјењених пробиотика на састав и ензимску активност цијевне микрофлоре код пациентата оболелих од инфламаторне болести цијева, као и утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина.

Научни циљ истраживања је стицање сазнања о наведеном проблему истраживања на бази релевантне грађе, што је кандидаткиња урадила детаљним описима до сада изведенih истраживања у области испитивања значаја ензимске активности цијевне флоре у метаболизму лијекова.

Уважавајући горе наведене чињенице, произашли су *циљеви докторске дисертације*:

Основни циљеви истраживања су били:

Испитати утицај краткотрајне и дуготрајне пероралне примјене пробиотика на састав и ензимску активност цијевне микрофлоре, као и утицај на обим разградње сулфасалазина у цијевима и настанак његових метаболита.

Ближи циљеви истраживања су били:

1. Испитати утицај пробиотика на број фекалних бактерија при аеробним и анаеробним условима култивисања
2. Испитати утицај пробиотика на број бактерија у мукусу зида цијева при

аеробним и анаеробним условима култивисања

3. Испитати утицај пробиотика на активност ензима азоредуктазе, нитроредуктазе, бета-глукозидазе и бета-глукуронидазе
4. Испитати метаболизам сулфасалазина *in vitro* при аеробним и анаеробним условима култивисања
5. Испитати метаболизам сулфасалазина *in vivo* при аеробним и анаеробним условима култивисања
6. Потврдити присуство пробиотских бактерија у фекалном садржају

На основу проблема, предмета и циљева истраживања , као и претходних сличних истраживања, постављена су *хипотезе истраживања* које гласе: 1. Краткотрајна перорална примјена пробиотика утиче на састав и ензимску активност цијевне микрофлоре, те повећава обим разградње сулфасалазина у цијевима и повећава настанак његових метаболита 2. Дуготрајна перорална примјена пробиотика утиче на састав и ензимску активност цијевне микрофлоре, те повећава обим разградње сулфасалазина у цијевима и повећава настанак његових метаболита.

IV 2.Преглед претходних истраживања

Преглед релевантне литературе даје ширу слику теме докторске дисертације. Уводни дио са прегледом литературе јасно даје увид у тренутна научна сазнања везана за бактеријску флору цијева и њену ензимску активност, механизме настанка инфламаторне болести цијева, примјену пробиотика и њихов утицај на метаболизам лијекова. Пробавни тракт човјека је колонизован великим бројем различитих микрорганизама, који чине комплексну, балансирану заједницу микроорганизама који су нормални становници пробавног тракта, а значајни су за физиологију исхране домаћина и контролу имуног система [1,2,3]. До појаве модерних молекуларних метода, култивацијским техникама се процењивало да нормалну цијевну микрофлору чини око 500 бактеријских врста, при чему је 30-40 доминантно. Данас можемо успјешно идентификовати и класификовати много већи број микрорганизама него раније када су кориштене искључиво култивацијске методе, јер је установљено да је jako велики број бактерија некултивибилиан [4,5].

Сматра се да једном насељени микрорганизми, формирају своју заједницу, која у нормалним условима остаје релативно стабилна током цијelog живота индивидуе. Сваки новоунесени микроорганизам тешко може истиснути већ постојеће, насељене бактерије при чему се цијевна флора сматра еквивалентом отиска прста [6] а чине је резидентне (симбионти) и пролазне бактерије. Симбионти успјешно

колонизују цријева и умножавају се континуирано, за разлику од пролазних бактерија којима то успијева само током кратког времена. Симбионтске бактерије су се, ради осигурања опстанка у пробавном тракту, прилагодиле антимикробним механизима домаћина. Све већи број података говори у прилог чињеници да симбионтски микроорганизми подстичу антимикробне системе домаћина чиме регулишу сопствени раст и бројност. На тај начин ове бактерије штите домаћина, јер би њихово неконтролисано умножавање, без обзира што не посједују факторе вирулентије, могло довести до продирања бактерија у интестинално ткиво и до неконтролисане имунолошке реакције интестиналног ткива, системске бактеријемије и сепсе [7]. На основу досадашњих истраживања, може се рећи да састав колонизујуће флоре утиче на индивидуалне варијације у имунитету домаћина. Сојеви бактерија за које је доказано да имају корисне особине по домаћина углавном припадају роду лактобацилуса и бифидобактерија, а управо та два рода се најчешће и користе као пробиотици. Неки сојеви имају додатне корисне аспекте као што је стимулација имуног одговора и компетитивно искључивање патогена [8]. Ензимска активност цријевних бактерија је велика, а обзиром на разноликост и број микророганизама, разумљив је снажан утицај на врсту и обим метаболичких процеса, посебно оних везаних за биотрансформацију ксенобиотика [9,10,11,12,13]. Упркос великој разноликости бактерија у пробавном тракту, метаболички процеси су највећим дијелом везани за редукцију и хидролизу, са малом фракцијом одговорном за цијепање, разградњу и реакције повезивања. С обзиром да је колон дио цријева са најбројнијом флором, данас се управо он сматра мјестом где се одвија највише метаболичких реакција [11]. Бројна истраживања указују да је цријевна флора укључена у патогенезу аутоимуних болести, а међу њима и у инфламаторну болест цријева [3,14,15,16,17].

За установљавање значаја цријевне флоре код болести попут инфламаторне болести цријева се користе испитивања метаболичке функције цријевне флоре [18].

Van de Wiel са сарадницима је на моделу гастроинтестиналног симулатора доказао да цријевна флора учествује у биоактивацији полицикличних ароматичних угљоводоника и њиховој трансформацији до супстанци које показују естрогенску активност [12]. У другом истраживању је уочено постојање разлике у фармаколошким ефектима орално унесених традиционалних кинеских лијекова. Установљено је да интестинални бактеријски метаболизам гинсенга, посебно гинсенозида РБ1 зависи од састава цријевне флоре [13]. Откривено је да је ендогена изложеност метилмеркуруу у директој зависности од његове елиминације, која се

одвија највећим дијелом преко феце [19]. У другим студијама је доказана способност срзнутих цријевних бактерија, посебно лактобацила, да вежу карциногене из хране посебно афлатоксин Б1 и контаминате хране AF 2 [20]. Досадашња истраживања су показала да бифидобактерије и лактобацили, који се најчешће користе као пробиотици, имају ниску производњу ензима значајних за метаболизам ксенобиотика као што су азоредуктаза, нитродектаза и бета глукуронидаза, у односу на друге главне анаеробе у цријевима [19]. Супротно томе показују високу активност бета глукозидазе која повећава производњу флавоноидских агликона који имају генотоксичне и антикарциногене особине. *Lactobacillus GG*, који је изолован из пробавног тракта здраве особе, дјелује тако што смањује активност бета-глукуронидазе у људи [21]. У истраживању на здравим добровољкама које су конзумирале шогурт са *Lactobacillus GG*, је уочено смањење активности фекалне бета глукуронидазе, нитродектазе и хидролазе гликохоличне киселине, док се активност бета глукозидазе и уреазе није значајније мијењала[22]. Истраживање проведено на пациентима обольелим од иритабилног колона или функционалне дијајереје, а који су третирани са мјешавином пробитика, је показала повећање активности фекалне бета галактозидазе и смањење активности уреазе током примјене пробиотика [23]. Савремени начин живота подразумијева све мању изложеност микроорганизмима од раног дјетињства што, сматра се, повећава предиспозицију за појаву алергија, већу подложност инфекцијама и настанак инфламаторних оболења [24]. Пробиотици су дефинисани као живи микроорганизми, који примјењени у адекватним количинама испољавају повољно дејство на људско здравље. Испитивање дјелотворности пробиотика у лијечењу инфекција, инфламаторних и алергијских болести је предмет многих истраживања [25,26,27,28,29]. Један од праваца истраживања везаних за дјеловање пробиотика је и појачање дјеловања стандардних лијекова који се користе у инфламаторној болести цријева. То је хронична, релапсна инфламаторна болест пробавног система, аутоимуне природе, која се манифестије у виду улцерозног колитиса и Кронове болести. Нова истраживања имунолошке, микробиолошке и генетичке основе обе форме болести подупиру тренутно важећи модел болести који каже да инфламаторна болест цријева представља оболење које настаје због поремећеног одговора цријевно-мукозног имуног система на антигене цријевних комензала код генетски осјетљивих особа. Због повезаности цријевне микрофлоре и ове болести, проводе се бројне студије са пробиотицима. У сличном истраживању проведеном на пациентима обольелим од реуматоидног артритиса, а лијечених сулфасалазином,

истовремена краткотрајна примјена пробиотика није довела нити до побољшања клиничког одговора, нити је значајно промијенила метаболизам сулфасалазина [30] иако је студија проведена на анималном моделу показала значајно повећање метаболизма сулфасалазина [31]. Овакви резултати нам показују да, резултате истраживања проведених на животињама не можемо директно пренијети на људе, те да постоји неоспорна потреба за спровођењем добро контролисаних клиничких испитивања на људима.

Литература цитирана у IV 2.

1. Yeoh N, Burton JP, Suppiah P, Reid G, Stebbings S. The role of microbiome in Rheumatic disease. *Curr Rheumatol Rep.* 2013; 15:314.
2. Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Fontana L, Gil A. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World Journal of Gastroenterology*: WJG. 2014; 20(42): 15632–15649. doi:10.3748/wjg.v20.i42.1563
3. Yu LC, Wyng JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 2012; 3 (1):27-43.
4. Rajilić-Stojanović M, De Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38(5):996-1047.
5. Bäckhed S, Bäckhed F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 2013; 11(4): 227-238.
6. Behnson J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.2013; 3(3):a010074
7. Van den AP, Van de Wiele T, Verstraete W, Possemiers S. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35: 681–704.
8. Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut.* 2002; 50:54-59.
9. Mikov M, Lee HJ, Fawcett JP. The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat gut contents. *Asian J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 2006; 6: 337-342.
10. Stojančević M, Bojić G, Salami HA i Mikov M. The influence of intestinal

- tract and probiotics on the fate of orally administered drugs. *Curr Issues Mol Biol* 2014;16(2):55-68.
11. Sousa T, Paterson R, Moore V, et al. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int J Pharm*(2008). 363: 1-25.
 12. Van de Wiele T, Vanhaecke L, Boeckaert C, et al. Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. *Environmental health perspectives*. 2005; 6-10.
 13. Kim KA, Jung IH, Park SH, et al. Comparative analysis of the gut microbiota in people with different levels of ginsenoside Rb1 degradation to compound K. *PLoS ONE*. 2013; 8(4): e62409.
 14. Tlaskalova-Hogenova H, Stipankova R, Kozakova H, et al. The role of gut microbiota (comensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disease and cancer. Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. 2011; 8:110-120.
 15. Ghouri A Y, Richards DM, Rahimi EF, Krill JT, Jelinek KA, DuPontet AW. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental gastroenterology*. 2014; 7: 473-487.
 16. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*: WJG. 2014;20(5):1165-1179.
 17. Harzallah D, Belhadj H. Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. *Kongo M*. 2013:197-216.
 18. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J. Fecal β -d-galactosidase production and bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*.1997; 42(4): 817-822.
 19. Rowland I. Modification of gut flora metabolism by probiotics and oligosaccharides. In: Fuller R, Heidt PJ, Rusch V, van der Waai D, eds. Old Herborn University Seminar Monograph 8: Probiotics: prospects of use in opportunistic infections. Herborn-Dill, Germany: Institute for Microbiology and Biochemistry; 1995: 35-46.
 20. Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, et al. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mut Res*. 1994; 311:

239–48.

21. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gaultier L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci.* 1992;37:121–8.
22. Ling WH, Korpela R, Mykkänen H, Salminen S, Hänninen O. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *The Journal of nutrition.* 1994; 124(1): 18-23.
23. Brigidia P, Vitalia B, Swennena E, Bazzocchib G, Matteuzzi D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res. Microbiol.* 2001; 152: 735–741
24. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology.* 2010; 6(5): 339-346.
25. Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therapeutic Advances in Gastroenterology.* 2010;3(5):307-319.
26. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160–174.
27. Gourbeyre P., Denery S., Bodinier M. Probiotics, prebiotics and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leucocyte Biology.* 2011; 89(5): 685-695.
28. Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology.* 2011 Sep 1;149(1):88-105.
29. Savard P, Lamarche B, Paradis ME, Thiboutot H, Laurin E, Roy D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology.* 2011; 149: 50–57.
30. Lee HJ, Waller RD, Stebbings S, Highton J, Orlovich DA, Schmierer D and Fawcett JP. The effects of an orally administered probiotic on sulfasalazine metabolism in individuals with rheumatoid arthritis: a preliminary study. *International Journal of Rheumatic Diseases.* 2010; 13:48–54. doi: 10.1111/j.1756-185X.2009.01449.
31. Mikov M, Lee HJ, Fawcett JP. The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat gut contents. *Asian J. Pharmacokinet*

Pharmacodyn 2006; 6:337-342.

IV 3. Допринос тезе у рјешавању изучаваног предмета истраживања

Бројна истраживања имунолошке, микробиолошке и генетичке основе обје форме инфламаторне болести цријева подупиру тренутно важећи модел болести који каже да је то оболење које настаје због поремећеног одговора цријевно-мукозног имуног система на антигене цријевних комензала код генетски осјетљивих особа. Сулфасалазин је лијек који се користи у лијечењу инфламаторне болести цријева и реуматоидног артритиса. Његова молекула садржи 5-аминосалицилну киселину и сулфапиридин који су везани азо везом, а која се примарно цијепа дјеловањем бактеријске азоредуктазе у колону. Сматра се да је сулфапиридин активни принцип дјелотворан у реуматоидном артритису због свог антибактеријског и имуномодулаторног дејства, док је 5-аминосалицилна киселина активни принцип у инфламаторној болести цријева. Због повезаности цријевне микрофлоре и инфламаторне болести цријева, проводе се бројне студије са пробиотицима. Један од правца истраживања везаних за дјеловање пробиотика је и појачање дјеловања стандардних лијекова, попут сулфасалазина, који се користе у инфламаторној болести цријева.

У данашњој, релевантној, научној литератури не постоје свеобухватна испитивања значаја цријевне микрофлоре за метаболизам лијекова и других ксенобиотика код људи.. С обзиром да се ови резултати не могу директно пренијети на људе, постоји потреба за спровођењем добро контролисаних клиничких испитивања на људима.

Током овог истраживања кандидаткиња је истражила да ли перорална примјена пробиотика утиче на састав и ензимску активност цријевне микрофлоре код пацијената обольелих од инфламаторне болести цријева, као и да ли пробиотици утичу на метаболизам сулфасалазина

IV 4. Научни и прагматични допринос дисертације

До сада није публикован рад који овако свеобухватно истражује утицај комбинације пробиотика на метаболичку активност цријевне флоре и метаболизам сулфасалазина. С овим је дат значајан *научни допринос дисертације* у истраживању као и у ширењу знања везаних за метаболичке капацитете цријевне флоре и значај пробиотика. *Прагматичан допринос дисертације* подразумијева подизање свијести љекара о важности препознавања цријевне флоре као важног метаболичког органа одговорног за метаболизам лијекова и других ксенобиотика.

В МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

V 1. Материјал и критеријуми

Материјал-испитаници и методе рада који су коришћене у овој дисертацији су усклађене са постављеним циљевима и приказане су на девет страница. Коришћени испитаници и метод истраживања, који су примењени у овој дисертацији омогућили су увид у испитивану проблематику и пружиле одговор на научни проблем, односно предмет испитивања. Испитивање је проведено као монокентрична, рандомизована, отворена, контролисана студија фазе IV са паралелним групама у трајању од 8 недјеља у коју је укључено 29 новообольелих особа.

Испитаници обольели од инфламаторне болести цијева су морали да испуне следеће *критеријуме за укључивање у испитивање*:

- Потписан информисани пристанак,
- Доб од 18-70 година
- Клинички индикована доња ендоскопија
- Ендоскопски потврђена инфламаторна болест цијева -новоткривена
- Патохистолошки потврђена инфламаторна болест цијева
- Амбулантни болесници

Критеријуми за не укључивање испитанника у студију

- Старост испод 18 година
- Псеудомемброзни колитис
- Позитиван налаз стомаце на патолошке бактерије, гљивице, протозое или паразите
- Постојање малигног оболења
- Постојање срчане инсуфицијенције
- Постојање бubreжне инсуфицијенције
- Постојање инсуфицијенције јетре
- Ранија алергија или неподношење сулфасалазина
- Ранија алергија или неподношење пробиотика
- Испитаници са метаболичком болешћу
- Труднице, дојиле и жене у генеративном периоду које не примењују адекватну заштиту од трудноће
- Изражена анемија (E< 2.5 милиона Hgb< 70)
- Примјена системских кортикоステроида дужа од 10 дана у претходна 2 мјесеца
- Систолни притисак већи од 160 mm Hg

-Дијастолни притисак већи од 95 mm Hg

-Учешће у другом клиничком испитивању у претходна 3 мјесеца.

Критеријуми за искључивање из студије

У случају акутне компликације или потребе за било којом клиничком интервенцијом која захтјева додатну терапију

Ако се развила нежељена реакција/догађај, која сама по себи условљава искључивање из студије

Ако је дошло до непоштовања усвојеног плана клиничког испитивања

На лични захтјев испитаника

Одлуком главног испитивача

V 2. Кратак увид у метод истраживања

Испитивана популација је подијељена у двије групе; групу Сулфасалазин (сулфасалазин таблете од 500 mg, Sulfasalazin, Krka) са 14 испитаника и групу Сулфасалазин и пробиотик (сулфасалазин таблете од 500 mg , Sulfasalazin, Krka и пробиотик Normia, Jadran Galenski Laboratorij) са 15 испитаника. Група Сулфасалазин је лијечена само сулфасалазином током 8 недјеља, а група Сулфасалазин и пробиотик је уз сулфасалазин током 8 недјеља добијала и пробиотик током 4 недјеље. У овој групи терапија са пробиотиком је почела 2 недјеље послиje почетка терапије сулфасалазином, и трајала је 2 недеље. Након тога је терапија пробиотиком прекинута током слиједеће 2 недеље, да би се потом поново укључила и трајала до истека испитивања. Контролни прегледи испитаника су вршени сваке двије недјеље, при чему су сакупљани узорци столице и 24-часовног урина. Узорци мукуса зида цијева су узети при првом ендоскопском прегледу те при контролној ендоскопији, након завршетка испитивања. Рађена је стандардна микробиолошка култивација цијевних бактерија из фекалног садржаја и цијевног мукуса на плочама са крвним агаром, у аеробним и анаеробним условима. Број бактеријских колонија је изражен као log 10. Ензимска активност цијевних бактерија у фекалном садржају (азоредуктаза, нитроредуктаза, бета-глукозидаза, бета-глукуронидаза) је одређивана спектрофотометријски. Мјерење вриједности сулфасалазина и његових метаболита, сулфапиридине и 5-аминосалицилне киселине, насталих *in vitro* у фекалној суспензији и из узорка 24-часовног урина, је вршено помоћу уређаја за течну хроматографију са масеним детектором (*LC-MS*). Идентификација пробиотских бактерија у фекалном садржају пацијената се вршила *PCR* методом и електрофорезом на чиповима. Све методе истраживања кориштене у

испитивања су адекватне, тачне и савремене имајући у виду достигнућа у овој области истраживања.

Промјена у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе није било.

Сви испитивани параметри, осим оних који се односе на одређивање броја бактерија из узорка мукуса зида колона што је кандидаткиња детаљно објаснила у дијелу дискусија, дају довољно елемената који чине ово истраживање квалитетним.

Статистичка обрада података је била адекватна. Сви резултати су представљени табеларним приказом и/или графички. Квалитативни подаци су приказани кроз број појава и процентуалну заступљеност. За приказ квантитативних података кориштени су показатељи дескриптивне статистике (број испитаника, аритметичка средина, стандардна девијација, стандардна грешка аритметичке средине, 95%-тни интервал повјерења за аритметичку средину, екстремне вриједности, квартили и медијана).

Нормалност расподјеле код посматраних обиљежја је тестирана Колмогоров-Смирнов-им тестом нормалности. За упоређивање средњих вредности обиљежја према испитиваној групи кориштен је ANOVA тест за понављајућа мјерења (ако посматрана обиљежја имају нормалну расподјелу), те непараметарски Friedman -ов тест за више независних узорака (ако посматрана обиљежја немају нормалну расподјелу). У случајевима када је помоћу ANOVA теста за понављајућа мјерења показана статистички значајна разлика у средњим вриједностима обиљежја, рађен је и Student-ов t тест за независне узорке ради упоређивања средњих вриједности обиљежја за свака два мјерења. У случајевима када је помоћу Friedman -овог теста за више независних узорака показана статистички значајна разлика у средњим вриједностима обиљежја, рађен је и Mann-Whitney U тест за два независна узорка ради упоређивања средњих вриједности обиљежја за свака два мјерења. Код кориштења Student -овог t теста за независне узорке, значајност разлике у варијансама посматраних обиљежја тестирана је F тестом. За упоређивање средњих вриједности посматраних обиљежја на различитим контролама кориштен је Student -ов t тест за упарене узорке (ако посматрана обиљежја имају нормалну расподјелу), односно непараметарски Wilcoxon- ов W тест (ако посматрана обиљежја немају нормалну расподјелу). За утврђивање степена повезаности (корелације) различитих обиљежја кориштена је Spearman-ова непараметарска корелација (у овим табелама г означава коефицијент повезаности или корелације, а p означава значајност корелације). Као статистички значајне узимане су вриједности у којима је $p < 0.05$.

За статистичку анализу, те табеларне и графичке приказе резултата кориштен је

следећи софтвер: IBM SPSS Statistics 21.0; MS Office Word 2010 и MS Office Excell 2010.

Анализирајући обрађени материјал, описане методе и материјал истраживања, а имајући у виду досадашња искуства и достигнућа у овој области комисија констатује да су примјењене методе адекватне, а испитивани параметри довољно обрађени и објективно тумачени.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

VI 1.Резултати истраживања

Добијени резултати ове докторске дисертације су приказани на 82 странице у дијелу резултати и још 50 страница у дијелу Прилози. Анализирани су кроз дискусију на десет страница. У дијелу истраживања у којем се испитивала *ензимска активност фекалне флоре*, кандидаткиња је дошла до следећих резултата: Активност азоредуктазе при аеробним условима култивисања је статистички значајно опадала у обе експерименталне групе. При анаеробним условима култивисања статистички значајан пад активности азоредуктазе је постојао само у групи Сулфасалазин и пробиотик. Активност нитроредуктазе је статистички значајно расла, у односу на вриједности прије почетка лијечења, у обе испитиване групе и при оба култивацијска услова. У групи лијеченој комбинацијом сулфасалазина и пробиотика је дошло до уочљивог пад активности нитроредуктазе након 2-седмичне примјене пробиотика. Активност бета-глукозидазе и бета-глукуронидазе је падала у односу на вриједности прије почетка лијечења, у обе испитиване групе и при оба култивацијска услова, при чему је код пацијената који су добијали и пробиотике пад бета-глукуронидазе био и статистички значајан. Активност оба ова ензима је била већа у групи сулфасалазин vs. сулфасалазин и пробиотик. У дијелу истраживања у којем се испитивао *број бактерија у фекалном садржају*, кандидаткиња је дошла до следећих резултата: Примјена сулфасалазина није довела до статистички значајне промјене броја фекалних бактерија ни при аеробним нити анаеробним условима култивисања, мада је био присутан тренд раста броја бактерија у односу на почетне вриједности. Ни примјена комбинације сулфасалазина и пробиотика није довела до статистички значајне промјене броја фекалних бактерија. И у овој експерименталној групи при аеробним условима култивисања број бактерија је растао, али је при анаеробним условима култивисања број бактерија опадао у односу на почетне вриједности. У дијелу истраживања у којем се испитивао *број бактерија у цијевном мукусу* кандидаткиња је закључила да ове резултате не може сматрати валидним

због техничких мањкавости у раду који се нису успјели превазићи, тако да нису ни уврштени у дисертацију. У дијелу истраживања у којем су се одређивали *сулфасалазин и његови метаболити излучени у урину*, кандидаткиња је дошла до слједећих резултата: Количина сулфасалазина излученог у урину није показала статистички значајну промјену нити у једној испитиваној групи, нити између група. Ни количина метаболита сулфапиридина се није статистички значајно мијењала нити у једној од група, иако је у групи сулфасалазин и пробиотик присутан благ пад на контролама проведеним послије 2-седмичног давања пробиотика. Количине метаболита месалазина такође нису показале статистички значајне промјене нити у једној групи испитаника, али су му вриједности у сулфасалазин групи расле у односу на почетне вриједности, док су му код испитаника третираних сулфасалазином и пробиотицима вриједности опадале. У дијелу истраживања у којем су се одређивали *сулфасалазин и његови метаболити у фекалном садржaju-in vitro метаболизам*, кандидаткиња је дошла до слједећих резултата: Количина сулфасалазина измјереног у узорку фецеса у обе експерименталне групе је показала тренд опадања. Количина метаболита сулфапиридина код испитаника у групи сулфасалазин је расла, док у групи лијеченој сулфасалазином и пробиотиком није дошло до статистички значајних промјена. Количина метаболита месалазина, код пацијената лијечених само сулфасалазином се није значајно мијењала, а у групи лијеченој сулфасалазином и пробиотиком је опала у односу на почетне вриједности. У дијелу истраживања у којем се вршила *идентификација пробиотских бактерија у фекалном садржaju*, кандидаткиња је дошла до слједећих резултата: Пролазна колонизација са *Bifidobacterium BB12* је потврђена код 22% испитиваних узорака, при чему је уочљиво повећање броја позитивних узорака на контролама које су слиједиле послије 2-седмичне примјене пробиотика. За разлику од *Bifidobacterium BB12*, *Lactobacillus rhamnosus LGG* није показала пролазну колонизацију пробавног тракта.

VI 2. Критичност и коректност тумчења резултата

Резултати истраживања су приказани на прегледан начин. Они су јасно и објективно тумачени, а кандидаткиња је показала објективан и критичан став у процјени резултата, посебно у дијелу који се односи на компарацију са резултатима сличних истраживања. Дискусија резултата показује да је кандидаткиња способна да прикупи, обради, презентује резултате на врло прегледан начин, као и да на јасан и свеобухватан начин разматра приказане резултате и упореди их са литературним подацима.

VI 3. Теоријски и практични допринос дисертације и нови истраживачки задаци

Основни теоријски допринос дисертације је сљедећи:

Ова докторска дисертација проширује постојећа знања о утицају пробиотика на број и метаболичку активности цријевних бактерија код обольелих од инафламаторне болести цријева. Анализирана је ензимска активност цријевне флоре и утицај пробиотика на њу. Уочено је пробиотици мијењају активност испитиваних ензима, али да та промјена не утиче на метаболизам сулфасалазина нити на број фекалних бактерија. Такође је уочено да је од мјешавине бактерија датих у облику пробиотика, само *Bifidobacterium BB12* показала пролазну колонизацију цријева испитаника док *Lactobacillus rhamnosus LGG* није показала пролазну колонизацију пробавног тракта.

Основни практични допринос дисертације је сљедећи:

Ова докторска дисертација својим предметом и проблематиком истраживања, указује на могућу примјену пробиотика прије свега као модулатора ензимске активности цријевне флоре. С обзиром да је већина досадашњих сазнања о метаболичкој активности цријевне флоре добијена, углавном истраживањима која се проводе на животињама и на *in vitro* моделима пробавног система, а много рјеђе клиничким истраживањима чини ово истраживање још драгоценјијим.

Основни правци даљих истраживања:

Резултати ове дисертације дају одговоре на постављени проблем истраживања, али и указује на наредне правце истраживања. Свакако је један од праваца истраживања установљавање оптималне методе узорковања цријевних бактерија које насељавају луминални слој мукуса цријева, а потом и одређивање њихове ензимске активност.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

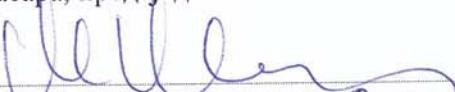
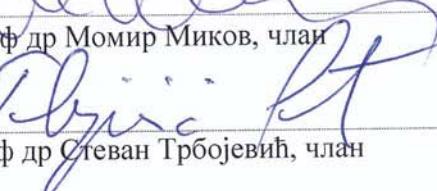
Докторска дисертација мр сц. Наташе Стојаковић под називом "Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обольелих од инфламаторне болести цијева" израђена је у складу са образложењем које је кандидат приложио приликом пријве теме. Докторска дисертација урађена је према правилима и принципима научно-истраживачког рада и резултат је оригиналног научног рада кандидата. Резултати истраживања јасно намећу закључак да пробиотици утичу на ензимску активност цијевне флоре.

Поред тога кандидаткиња је прецизно и логички анализирала предложену тему истраживања и довела податке у везу са постављеном хипотезом. Такође, кандидаткиња је тему ове дисертације, кроз јасно и концизно писање учинила интересантном и корисном и за истраживаче и за практичаре. Дисертација представља оригинални допринос фармакологији и медицинској науци, јер проширује постојећа знања о пробиотицима и метаболичкој активности цијевне флоре.

Чланови Комисије, на основу укупне оцјене докторске дисертације једногласно дају позитивну оцјену о завршеној докторској дисертацији под називом: "Утицај пробиотика на метаболизам сулфасалазина у обольелих од инфламаторне болести цијева" мр сц. Наташе Стојаковић и предлаже члановима Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвате овај Извјештај и омогуће кандидату да своју докторску дисертацију јавно брани.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум: 24. 4. 2017.

1. 
Проф др Светлана Стоисављевић
Шатара, предсједник
2. 
Проф др Момир Миков, члан
3. 
Проф др Стеван Трбојевић, члан