

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 12. 06. 2025. године, одлука бр. 619/7, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер биолога Радмиле Миљковић, истраживача сарадника у Институту за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“, под насловом:

„Профилактичко дејство рекомбинантне изоформе лектина банане у запаљенским болестима црева: испитивање на моделу хемијски-индукованог колитиса у миша“

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 29. 04. 2021. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације под редним бројем 61206-1218/4-21. Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно – научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Радмиле Д. Миљковић (рођ. Ђокић) под насловом **„Профилактичко дејство рекомбинантне изоформе лектина банане у запаљенским болестима црева: испитивање на моделу хемијски-индукованог колитиса у миша“**, написана је на српском језику, на 95 страна А4 формата (фонт Times New Roman величине 12 pt, са проредом 1,0, маргинама 2 cm) и садржи 43 слике, 11 табела и 288 литературних навода. Дисертација се састоји из 6 поглавља: *Увод* (16 страна), *Циљеви рада* (2 стране), *Материјал и методе* (10 страна), *Резултати и дискусија* (42 стране), *Закључци* (3 стране) и *Литература* (20 страна). Поред тога, дисертација садржи: *Захвалницу* на српском језику, *Сажетке* на српском и енглеском језику, *Садржај*, *Биографију кандидата* на српском језику, *Изјаву о ауторству*, *Изјаву о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада* и *Изјаву о коришћењу*.

У **Уводу** је дат преглед литературе која је релевантна за истраживања реализована у оквиру израде ове докторске дисертације. Кроз четири поглавља у оквиру Увода наведени су подаци који се односе на (1) лектине и њихову интеракцију са имунским системом, са посебним освртом на лектин банане, (2) лимфоидно ткиво придружено гастроинтестиналном тракту, (3) запаљенске болести црева, са освртом на експерименталне моделе који се користе у истраживањима, и (4) улогу микробиоте у

патофизиологији запаљенских болести црева. Навођењем ових података је указано на потребу за новим агенасима који могу утицати на појаву и интензитет симптома запаљенских болести црева, са посебним освртом на могућност и потенцијална ограничења примене лектина.

У поглављу **Циљеви рада** је наведено да је предмет истраживања ове докторске дисертације имуномодулаторни утицај рекомбинантне изоформе лектина банане (рБанЛек) у гастроинтестиналном тракту C57BL/6 мишева, са циљем стицања увида у могућности примене рБанЛек у контроли запаљенских болести црева. Ради остварења наведеног циља, истраживања су обухватала испитивања ефеката рБанЛек при различитим режимима примене (једнократно интраректално, вишедневно орално) у физиолошким условима и током успостављеног инфламаторног процеса, и реализована су у три фазе чији су специфични циљеви били: (1) анализа имуномодулаторног утицаја рБанЛек у гастроинтестиналном тракту у физиолошким условима, (2) анализа ефеката једнократне профилактичке примене рБанЛек у моделу хемијски индукованог колитиса у C57BL/6 мишу, и (3) анализа ефеката примене рБанЛек као имуномодулатора у хемијски индукованом колитису у C57BL/6 мишу.

Поглавље **Материјал и методе** обухвата информације о реагенсима и инструментима који су коришћени приликом извођења експерименталних процедура. Описани су поступак култивације и стимулације Сасо-2 ћелија и експерименти на животињама, уз навођење да су све експерименталне процедуре на животињама рађене у складу са ЗР принципом и одобрене од Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије (одобрења бр. 323-07-01577/2016-05/11, 323-07-03902/2017-05/1 и бр. 323-07-12928/2022-05/2). Такође, дати су детаљани прикази припреме узорка за анализу и поступака *ex vivo* анализа (изоловање ДНК и РНК, електрофореза у агарозном гелу, идентификација бактерија секвенционирањем, qPCR, анализа активности ензима и концентрације протеина колориметријским методама, хистолошке анализе, проточна цитофлуориметрија, ELISA), као и статистичких анализа коришћених при обради података.

У поглављу **Резултати и дискусија** су приказани и дискутовани резултати добијени током израде дисертације. Према специфичним циљевима дефинисаним у оквиру поглавља Циљеви рада, поглавље је организовано у три целине у оквиру којих је приказ резултата везаних за остварење специфичног циља праћен њиховом свеобухватном дискусијом. У оквиру дела *„Имуномодулаторни ефекат рБанЛек у ГИТ C57BL/6 миша у физиолошким условима“* приказани су (1) утицај тридесетодневне оралне примене рБанЛека на опште стање животиња, карактеристике имунског миљеа у дебелом цреву и карактеристике цревне микробиоте, и (2) динамичан (24h и 48h након третмана) дозно-зависан (0,1, 1 и 10 $\mu\text{g/mL}$) утицај једнократне интраректалне примене рБанЛек на цитокински миље и продукцију реактивних молекулских врста кисеоника и азота у дебелом цреву, као и на карактеристике дендритичних и Т ћелија у мезентеричним лимфним чворовима. Поред тога, у овом делу су приказани и резултати добијени у култури Сасо-2 ћелија које су коришћене као модел систем за испитивање директног утицаја рБанЛек на епител црева. У делу *„Евалуација ефекта једнократног*

профилактичког третмана рБанЛек у моделу ТНБС-изазваног колитиса у C57BL/6 мишу“ приказан је утицај једнократне профилактичке интраректалне примене рБанЛек (0,1, 1 и 10 µg/mL), урађене 24h или 48h пре индукције експерименталног колитиса, на тежину клиничке слике (телесна тежина, дужина дебелог црева, хистолошки индекс колитиса) и локалне имунолошке параметре (про/анти оксидативни статус, цитокински миље) у пику болести и опоравку. Део „*Орална примена рБанЛек као имуномодулатора током ТНБС-изазваног колитиса у C57BL/6 мишу*“ приказује утицај свакодневне оралне примене рБанЛек (0,1, 1 и 10 µg/mL) током експерименталног колитиса на тежину клиничке слике (телесна тежина, дужина дебелог црева, хистолошки индекс колитиса) и локалне имунолошке параметре у пику болести и опоравку (про/анти оксидативни статус, цитокински миље, заступљеност Т регулаторних ћелија у мезентеричним лимфним чворовима).

У поглављу **Закључци** сумирани су резултати добијени у оквиру докторске дисертације и наведени закључци који су на основу њих донети.

У делу **Литература** наведене су 288 библиографске јединице из области истраживања које су разматране при писању тезе.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

Представљени резултати указују да примена рБанЛек у ниским дозама у моделу индукованог колитиса ТНБС (2, 4, 6 – тринитробензен сулфонска киселина) код C57BL/6 мишева доводи до значајног смањења тежине болести и убрзаног опоравка, уз модулацију локалног имунског одговора у дебелом цреву. Ови ефекти су изражено дозно-зависни, што наглашава потребу за пажљивим дозирањем при примени рБанЛек у контексту запаљенских болести црева (енгл. Inflammatory Bowel Disease, ИБД).

У физиолошким условима, рБанЛек у концентрацијама ≤ 1 µg/mL није показао цитотоксичност нити иницирао нежељене запаљенске одговоре у епителу црева, док је при већим концентрацијама (10 µg/mL) уочен благ негативан утицај на вијабилност ћелија. Дуготрајна орална суплементација (0,01 µg/дан) није значајно утицала на промене у активности антиоксидативних ензима нити на локални цитокински миље, али је довела до смањења активности ензима мијелопероксидазе (МПО), до промене у саставу микробиоте и довела је до благе инфилтрације имунских ћелија у лимфоидно ткиво гастроинтестиналног тракта. Једнократни интраректални третмани су изазвали изражене дозно-зависне промене у локалној производњи инфламаторних и регулаторних цитокина (TNF, IL-6, IL-10, TGFβ, IL-12, IFNγ, GM-CSF), као и промене у фенотипу и заступљености појединих популација антиген-презентујућих ћелија у *lamina propria* слоју. Веће дозе рБанЛек су промовисале повећање заступљености CD103⁺CD11b⁻ дендритских ћелија, док су мање дозе довеле до повећања CD103⁺CD11b⁺ ћелијске субпопулације. Ове промене указују на контролисан имуномодулаторни потенцијал рБанЛек у мукози дебелог црева.

Једнократне профилактичке интаректалне примене рБанЛек 24h или 48h пре изазивања колитиса, иако нису спречиле сам развој болести, довеле су до значајног ублажења клиничке слике и бржег опоравка. Најизраженији ефекат постигнут је третманом 0,1 $\mu\text{g/mL}$ рБанЛек. Ефекат се огледао у повећању активности антиоксидативних ензима, смањењу продукције азот-оксида, модулацији активности МПО и повећању продукције регулаторних цитокина (IL-10 и TGF β). Пораст локалне продукције регулаторних цитокина у пикну болести је био израженији у групама претретираним 24h пре изазивања болести. Дозно-зависни образац промена локалних концентрација TNF и IL-12 у пикну болести се разликовао за групе третиране 24 сата (повећање производње ових цитокина у групи 24rBL10) и групе третиране 48h (најнижа производња цитокина у групи 48rBL10) пре индукције болести. Део добијених резултата је објављен у врхунском међународном часопису *Biomolecules* (doi:<https://doi.org/10.3390/biom15040476>).

Орална примена рБанЛек током активне фазе болести показала је такође дозно-зависни позитивни ефекат. Примена 0,1 $\mu\text{g/mL}$ рБанЛек је била најефикаснија у ублажавању клиничке слике у пикну болести. Позитивно дејство оралног третмана рБанЛек у колитису изазваним ТНБС је било повезано са повећањем локалне производње регулаторних цитокина и смањењем производње / активности проинфламаторних медијатора (TNF, азот-оксид, МПО). Пораст активности МПО у фази опоравка је указао да позитивно дејство рБанЛек у фази опоравка може да буде повезано са анти-инфламаторном активношћу неутрофила. Такође су уочене и промене у заступљености Т регулаторних ћелија и експресији IFN γ у CD4⁺ лимфоцитима – највећи пораст заступљености регулаторних ћелија и најмањи продукција IFN γ уочени су у групи третираној са 0,1 $\mu\text{g/mL}$ рБанЛек у којој је уочена и најблажа клиничка слика. Део добијених резултата је објављен у врхунском међународном часопису *Nutrients* (doi:<https://doi.org/10.3390/nu16111705>).

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације указују да рБанЛек, примењен у одређеном дозном опсегу, остварује антиинфламаторне ефекте који позитивно утичу на интензитет и ток запаљенског процеса у гастроинтестиналном тракту. Овакви налази су у складу са великим бројем резултата који указују на могућност примене лектина као имуноактивних молекула у лечењу запаљенских болести [1-3]. Уочена дозно-зависна ефикасност рБанЛек у контроли ИБД се огледа у ублажавању клиничке слике, смањењу хистопатолошких промена у ткиву дебелог црева, индукцији регулаторних цитокина и модулацији активности проинфламаторних медијатора. Тако резултати који указују да је позитиван ефекат једнократног рБанЛек претретмана на тежину клиничке слике ТНБС-индукованог колитиса повезан са порастом локалне активности антиоксидативних одбрамбених механизма у складу су са налазом да је активност ензима супероксид дисмутазе смањена код пацова којима је индукован ТНБС колитис [4]. Такође, позитивна корелација између пораста локалне продукције IL-10 и/или TGF- β након (пре)третмана

рБанЛек и ублажења клиничке слике у пику болести у складу је са налазима да IL-10 и TGF- β имају кључну улогу у контроли ИБД [5].

Резултати који су показали да вишедневна орална примена рБанЛек доводи до промена у саставу цревне микробиоте у сагласности је са бројним налазима који показују да се маноза-везујући лектини везују за одређене гликокоњугате који се налазе на површини бактерија, гљива и протозоа [6]. Интерагујући са олигосахаридним структурама они мењају структуру, стабилност и пропустљивост ћелијске мембране, чиме инхибирају раст и размножавање или изазивају смрт микроорганизама. Конкретно, рБанЛек третман је довео до смањења разноврсности цревне микробиоте и повећања заступљености бактеријских фамилија *Bacteroidaceae* и *Deferribacteraceae*. Литературни подаци показују да бактерије обе ове фамилије испољавају имуномодулаторни ефекат у гастроинтестиналном тракту, с тим што је, у контексту ИБД, утицај *Bacteroidaceae* фамилије позитиван [7,8] а утицај *Deferribacteraceae* фамилије негативан [9]. У складу са налазима који указују на значај микробиоте у обликовању имунског одговора [10], може се претпоставити да је имуномодулаторно дејство рБанЛек у гастроинтестиналном тракту директно али и посредно, преко утицаја на састав микробиоте.

У литератури се често истиче значај биљне исхране у контроли ИБД [11,12]. Бројна истраживања потврђују повољан ефекат биљне исхране, али и указују да се не сме занемарити њени потенцијално нежељени ефекти, делом повезани са лектинима. Генерално, резултати приказани у оквиру тезе су у складу са налазима да биљни лектини, зависно од дозе и специфичности, могу допринети успостављању анти-инфламаторног миљеа, али могу и интензивирати инфламаторни одговор [13,14]. Чињеница да ниске дозе рБанЛек ублажавају клиничку слику, док високе дозе појачавају инфламаторни одговор, јасно потврђује да је прецизно дозирање лектина кључно за успех третмана.

Литература:

1. Campos, J.K.; Araújo, C.S.; Araújo, T.F.; Santos, A.F.; Teixeira, J.A.; Lima, V.L.; Coelho, L.C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Bauhinia monandra leaf lectin. *Biochimie open* **2016**, *2*, 62-68, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopen.2016.03.001>.
2. e Lacerda, R.R.; Moreira, I.C.; do Nascimento, J.S.J.; de Lacerda, A.C.S.; Cabral, N.L.; Lucetti, D.L.; de Barros Viana, G.S.; Felipe, C.; Bezerra, i.F.; Pessoa, H.d.L.F.; et al. Lectin isolated from Brazilian seeds of velvet bean (*Mucuna pruriens* (L) DC.) presents analgesic, anti-inflammatory and antihemolytic action. *Journal of Medicinal Plants Research* **2015**, *9*, 231-242, doi:<https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5693>.
3. Oladokun, B.O.; Omisore, O.N.; Osukoya, O.A.; Kuku, A. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of Tetracarpidium conophorum seed lectin. *Scientific African* **2019**, *3*, e00073, doi:<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00073>.
4. Rabelo Socca, E.A.; Luiz-Ferreira, A.; de Faria, F.M.; de Almeida, A.C.; Dunder, R.J.; Manzo, L.P.; Souza Brito, A.R.M. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and cyclooxygenase-2 by Isatin: A molecular mechanism of protection against TNBS-induced colitis in rats. *Chemico-Biological Interactions* **2014**, *209*, 48-55, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.019>.

5. Fuss, I.J.; Boirivant, M.; Lacy, B.; Strober, W. The Interrelated Roles of TGF- β and IL-10 in the Regulation of Experimental Colitis. *The Journal of Immunology* **2002**, *168*, 900-908, doi:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.900>.
6. Breitenbach Barroso Coelho, L.C.; Marcelino dos Santos Silva, P.; Felix de Oliveira, W.; de Moura, M.C.; Viana Pontual, E.; Soares Gomes, F.; Guedes Paiva, P.M.; Napoleão, T.H.; dos Santos Correia, M.T. Lectins as antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology* **2018**, *125*, 1238-1252, doi:<https://doi.org/10.1111/jam.14055>.
7. Chng, K.R.; Ghosh, T.S.; Tan, Y.H.; Nandi, T.; Lee, I.R.; Ng, A.H.Q.; Li, C.; Ravikrishnan, A.; Lim, K.M.; Lye, D.; et al. Metagenome-wide association analysis identifies microbial determinants of post-antibiotic ecological recovery in the gut. *Nature Ecology & Evolution* **2020**, *4*, 1256-1267, doi:<https://doi.org/10.1038/s41559-020-1236-0>.
8. Hudcovic, T.; Kozakova, H.; Kolinska, J.; Stepankova, R.; Hrnčir, T.; Tlaskalova-Hogenova, H. Monocolonization with *Bacteroides ovatus* protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long-lasting dextran sodium sulfate treatment. *Physiological research* **2009**, *58*, doi:<https://doi.org/10.33549/physiolres.931340>.
9. Singh, S.B.; Carroll-Portillo, A.; Lin, H.C. Desulfovibrio in the gut: the enemy within? *Microorganisms* **2023**, *11*, 1772, doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071772>.
10. Qiu, P.; Ishimoto, T.; Fu, L.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Liu, Y. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**, *12*, 733992, doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.733992>.
11. Chiba, M.; Nakane, K.; Takayama, Y.; Sugawara, K.; Ohno, H.; Ishii, H.; Tsuda, S.; Tsuji, T.; Komatsu, M.; Sugawara, T. Development and Application of a Plant-Based Diet Scoring System for Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Perm J* **2016**, *20*, 16-019, doi:<https://doi.org/10.7812/tpp/16-019>.
12. Triantafyllidi, A.; Xanthos, T.; Papalois, A.; Triantafyllidis, J.K. Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* **2015**, *28*, 210-220, doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4367210/>.
13. Konozy, E.H.E.; Osman, M.E.M. From inflammation to immune regulation: The dual nature of dietary lectins in health and disease. *Heliyon* **2024**, *10*, e39471, doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39471>.
14. Gong, T.; Wang, X.; Yang, Y.; Yan, Y.; Yu, C.; Zhou, R.; Jiang, W. Plant Lectins Activate the NLRP3 Inflammasome To Promote Inflammatory Disorders. *J Immunol* **2017**, *198*, 2082-2092, doi:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600145>.

Г. Објављени и саопштени радови који чине део дисертације

Радмила Миљковић је објавила два рада из тезе, оба у врхунским међународним часописима (M21). Део резултата је приказан на једном скупу међународног значаја (M34) и једном скупу националног значаја (M64).

Радови објављени у врхунском међународном часопису (M21):

1. **Miljković, R.**; Marinković, E.; Prodić, I.; Kovačević, A.; Protić-Rosić, I.; Vasić, M.; Lukić, I.; Gavrović-Jankulović, M.; Stojanović, M. Ameliorative Effect of Banana Lectin in TNBS-Induced Colitis in C57BL/6 Mice Relies on the Promotion of Antioxidative Mechanisms in the Colon. *Biomolecules* **2025**, *15*, 476, doi:<https://doi.org/10.3390/biom15040476>.

2. **Miljkovic, R.**; Marinkovic, E.; Lukic, I.; Kovacevic, A.; Lopandic, Z.; Popovic, M.; Gavrovic-Jankulovic, M.; Schabussova, I.; Inic-Kanada, A.; Stojanovic, M. Banana Lectin: A Novel Immunomodulatory Strategy for Mitigating Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* **2024**, *16*, 1705, doi:<https://doi.org/10.3390/nu16111705>.

Саопштења на скупу међународног значаја (M34):

1. **Miljković, R.**; Marinković, E.; Kovačević, A.; Lukić, I.; Popović, M.; Lopandić, Z.; Gavrović-Jankulović, M.; Stojanović, M. The impact of prophylactic treatment of recombinant banana lectin on the innate immune response in TNBS induced colitis in C57BL/6 mice. *14th Dresden Symposium on Autoantibodies*, Dresden, September 10-13, 2019.

Саопштења на скупу националног значаја (M64):

1. **Miljković, R.**; Lukić, I.; Marinković, E.; Kovačević, A.; Popović, M.; Lopandić, Z.; Gavrović-Jankulović, M.; Stojanović, M. Prophylactic treatment by banana lectin influences the immune response in the peak of experimental colitis. *Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches*, Abstract book, Hotel Mona Plaza Belgrade, December 6-8, 2019, 52-52.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност докторске дисертације под називом **„Профилактичко дејство рекомбинантне изоформе лектина банане у запаљенским болестима црева: испитивање на моделу хемијски-индукованог колитиса у миша“**, аутора Радмиле Миљковић, проверена је на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018). Помоћу програма iThenticate утврђен је степен подударности текста 18%. Приказани степен подударности је последица личних имена и афилијација, назива једињења, опште коришћених скраћеница и термина везаних за област истраживања, описа стандардних аналитичких процедура, као и навођења библиографских података о коришћеној литератури.

На основу свега изнетог, Комисија сматра да извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Радмиле Миљковић, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Е. Закључак

На основу свега изложеног Комисија закључује да је у поднетој дисертацији под насловом **„Профилактичко дејство рекомбинантне изоформе лектина банане у запаљенским болестима црева: испитивање на моделу хемијски-индукованог колитиса у миша“** кандидат, мастер биолог Радмила Д. Миљковић, успешно одговорила на све постављене задатке који се односе на анализе утицаја рБанЛек на ток ТНБС изазваног колитиса у C57BL/6 мишу и карактеристике пратећег имунског одговора. Комисија сматра да резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације представљају значајан и оригиналан научни допринос у разумевању могућности примене рБанЛек у контроли запаљенских болести црева, с обзиром да је детаљно испитан утицај рБанЛек на тежину клиничке слике и ток болести.

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у оквиру два научна рада у врхунским међународним часописима (M21) и приказани на једном скупу међународног значаја (M34) и једном скупу националног значаја (M64).

На основу свега изложеног Комисија сматра да се ова дисертација уклапа у савремене трендове истраживања у области биохемије, и на основу свега изложеног предлаже Наставно–научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да прихвати поднету докторску дисертацију Радмиле Д. Миљковић под називом **„Профилактичко дејство рекомбинантне изоформе лектина банане у запаљенским болестима црева: испитивање на моделу хемијски-индукованог колитиса у миша“** и одобри њену одбрану.

У Београду, 24. 07. 2025.

Комисија:

Др Милица Поповић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Др Маријана Стојановић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

Др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Др Марија Стојадиновић, доцент
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Др Ивана Продић, виши научни сарадник
Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“