

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На III редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 16.12.2022. године, на основу молбе ментора, Биљане Божић Недељковић, редовног професора Биолошког факултета, Универзитета у Београду и Тамаре Саксида, научног саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Драгице М. Мићановић**, (девојачко презиме **Гајић**) истраживача сарадника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, под насловом: **„Утицај воденог екстракта плода ароније на имунски систем у мишијим моделима инфекције и меланома“**, у саставу:

1. др Ивана Стојановић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду
2. др Катарина Митић, виши научни сарадник, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
3. др Катарина Шавикин, научни саветник, Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Драгице М. Мићановић под насловом „Утицај воденог екстракта плода ароније на имунски систем у мишијим моделима инфекције и меланома ” обухвата 109 страница текста и 24 слике и 18 графика. Текст се састоји од 7 поглавља и то: Увод (16 страна), Циљеви рада (3 стране), Материјал и методе (18 страна), Резултати (38 страна), Дискусија (12 страна), Закључци (3 стране) и Литература (19 страна).

Предмет ове докторске дисертације је испитивање утицаја воденог екстракта плода ароније (ВЕПА) на ћелије имунског система *in vitro* и *in vivo*, као и на одговор имунског система у мишијим моделима инфекције и меланома.

Експериментални део рада у оквиру докторске дисертације урађен је у Одељењу за имунологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, а процедуре које су укључивале рад са животињама су одобрене од стране етичке комисије Управе за ветерину (решење бр. 323-07-01819/2020-05 и 323-07-07965/2020-05).

Резултати истраживања које је кандидаткиња Драгица М. Мићановић приказала у овој дисертацији пружају нова сазнања о потенцијалу екстракта ароније да стимулише одговор имунског система у терапији инфекције *Listeria monocytogenes* и меланома.

Listeria monocytogenes, факултативно анаеробна бактерија, изазива листериозу након уношења контаминираних хране, која се у 20-30% случајева завршава смртним исходом. Отпорност на антибиотике је у порасту те су научно оправдана истраживања која би довела до нових терапијских модалитета листериозе. Меланом представља најсмртоноснији рак коже, чији је узрочник неконтролисано умножавање меланоцита. Током 2020. године забележено је више од 320.000 нових случајева меланома у свету, од чега 46,4% у Европи, док петогодишња преваленца износи 14 случајева на 100.000 људи. Терапија меланома је отежана различитим начинима на који меланом избегава деловање имунског система, и нежељеним дејствима

примењених лекова, те је истраживање о усмеравању имунског система домаћина да делује анти-туморски сврсисходно. Истраживања спроведена у овој докторској дисертацији су била посвећена и испитивању деловања ВЕПА на функционисање имунског система, те имају и базични значај. Конкретно, показано је да ВЕПА остварује снажан имуномодулацијски ефекат, како *in vitro* тако и *in vivo*. ВЕПА дат оралном гаважом код здравих животиња доводи до промена у дистрибуцији ћелија имунског система у цревима, и до повећања продукције проинфламацијског цитокина интерферона-гама (енгл., *interferon-gamma*, IFN- γ). У моделима инфекције и меланома, претретман ВЕПА делује протективно, односно поспешује елиминацију бактерије и успорава развој тумора. Уочени ефекти ВЕПА се могу приписати стимулацији како броја тако и функција ћелија имунског система које су укључене у антибактеријски, односно антитуморски одговор.

АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод докторске дисертације има три дела у којима су приказани релевантни подаци за разумевање теме ове докторске дисертације. У првом делу дати су основни подаци о црној аронији, *Aronia melanocarpa* (Rosaceae), укључујући хемијски састав плода и биолошка својства. Изнети су литературни подаци о факторима који могу утицати на хемијски састав плода, као и о подаци о антиоксидативним, антибактеријским, антивирусним и антитуморским дејствима ароније. У другом делу су приказани постојећи подаци о *L. monocytogenes*, конкретно о етиологији и епидемиологији инфекције, потом је детаљно обрађен имунски одговор домаћина и наведени су експериментални модели који се користе у научним истраживањима. У трећем делу је приказана етиологија и епидемиологија меланома, а посебно се говори о имунском одговору на меланом и начинима на који меланом избегава имунски одговор домаћина. Обрађени су и наведени експериментални модели меланома. На крају су дати и разлози који стоје иза проучавања спроведених у овој докторској дисертацији.

У оквиру поглавља **Циљеви истраживања** кандидаткиња на основу досадашњих

података о проинфламацијском, али и антиинфламацијском деловању различитих екстраката ароније, поставља основни циљ овог истраживања – да водени екстракт плода ароније остварује имуномодулацијско дејство и да претретман мишева овим екстрактом стимулише антибактеријски и антитуморски имунски одговор. Из наведеног основног циља произашли су следећи специфични циљеви:

1. Да се *in vitro* и *in vivo* испита дејство ВЕПА на ћелије урођене и стечене имуности
2. Да се испита дејство претретмана ВЕПА на елиминацију *L. monocytogenes* у BALB/c мишева и да се одреде ћелијски и молекуларни механизми уочених ефеката
3. Да се испита дејство претретмана ВЕПА на развој меланома у C57BL/6 мишева и да се одреде ћелијски и молекуларни механизми уочених ефеката

За сваки од наведених циљева дати су прецизни подаци о приступима који ће се користити за њихово постизање.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** описане су имунолошке и молекуларнобиолошке методе које су коришћене у реализацији постављених циљева. Прво су наведени реагенси, раствори и медијуми коришћени током израде експеримената, описан је поступак прикупљања биљног материјала и припрема ВЕПА, припрема *L. monocytogenes*, култивисање В16 ћелијске линије меланома и коришћење експерименталних животиња. Такође, описани су и начини примене ВЕПА у здравих BALB/c и C57BL/6 мишева, као и претретмани приликом инфекције *L. monocytogenes* и приликом индукције меланома. Потом су дати протоколи за изоловање ћелија из слезине, лимфних чворова, Пејерових плоча, танког црева и тумора, као и одређивање броја ћелија у узорцима и одређивање CFU *L. monocytogenes*. Описана је и диференцијација дендритских ћелија *in vitro*, као и диференцијација пречишћених наивних Т лимфоцита ка Th1, Th17 и Treg субпопулацијама. Следећу групу описаних метода чине методе коришћене за испитивање вијабилности и функције ћелија имунског система - кристал виолет и МТТ тест (за одређивање вијабилности ћелија), Грисова реакција (за одређивање

концентрације нитрита у супернатанима ћелијских култура), ELISA (за одређивање концентрације цитокина у супернатантима ћелијских култура) и LDH тест (за одређивање цитотоксичности). Наведене су коришћене хистолошке методе: припрема хистолошких препарата у парафину и бојење хематоксилином и еозином. Укратко је објашњена метода проточне цитофлуориметрије, те су у овом делу наведени и протоколи за одређивање заступљености, типа и функционалног стања ћелија имунског система, укључујући одређивање нивоа ћелијске смрти, фагоцитозе и продукције реактивних врста кисеоника. Следећа је описана метода имуноблота, почев од изолације протеина, преко електрофорезе на SDS-полиакриламидном гелу, трансфера протеина на мембрану и визуелизације протеинских трака. Затим је објашњена метода реакције ланчаног умножавања у реалном времену (за одређивање експресије гена од интереса), којој су претходили изолација укупне РНК и реверзна транскрипција. Коначно, наведене су и коришћене статистичке методе, као и софтвер који је коришћен за анализу добијених резултата.

У поглављу **Резултати**, кандидаткиња је јасно и прегледно приказала резултате спроведених истраживања које је груписала у пет целина. Свака од целина састоји се од поглавља у којима су на конзистентан начин и графички документовано приказани добијени експериментални подаци.

У првом делу приказани су резултати одређивања садржаја фенола у ВЕПА, приказани табеларно према главним групама фенолних једињења.

Следећи део се односи на резултате примене ВЕПА на ћелије имунског система C57BL/6 миша *in vitro*. Показано је да ВЕПА, не утичући на вијабилност дендритских ћелија, остварује имуномодулацијско дејство на ове ћелије тако што повећава продукцију азот-моноксида и проинфламацијског цитокина TNF (енгл., tumor necrosis factor). ВЕПА утиче на функције макрофага тако што повећава њихову способност фагоцитозе и повећава продукцију проинфламацијских цитокина IL-6 и IL-12. ВЕПА делује на ћелије стечене имуности тако што значајно повећава заступљеност и CD4 и CD8 Т лимфоцита и Б лимфоцита, без утицаја на продукцију репрезентативних цитокина у овим културама. Међутим, ВЕПА делује на *in vitro* диференциране наивне Т лимфоците тако што

попешује Th1 диференцијацију, а супримира диференцијацију у Treg фенотип.

У трећем делу резултата кандидаткиња испитује дејство ВЕПА на ћелије имунског система црева, зато што су мишеви третирани оралном гаважом. Показано је да ВЕПА мења заступљеност ћелија урођеног и стеченог имунитета унутар Пејерових плоча и интраепителних лимфоцита, без утицаја на морфологију танког црева. Приликом оралног третмана ВЕПА у здравих мишева, на нивоу слезине је остварен имуномодулацијски ефекат тако што је повећана продукција проинфламацијског цитокина IFN- γ .

У четвртом делу се износе резултати добијени приликом оралног претретмана мишева ВЕПА-ом који су инфицирани бактеријом *L. monocytogenes*. Кандидаткиња на основу изнетих резултата одуства промене телесне масе мишева који су претретирани ВЕПА и на основу мањег броја CFU у слезини закључује да ВЕПА доприноси бржој елиминацији *L. monocytogenes* из организма. Овакав ефекат се приписује повећавању заступљености ћелија које су од значаја за елиминацију бактерије (повећање заступљености макрофага и цитотоксичних Т лимфоцита на нивоу Пејерових плоча и слезине), повећањем молекула одговорних за антибактеријски одговор (повећање перфорина у слезини, повећање иРНК за IL-6 у слезини), појачавање фагоцитних способности ћелија (у слезини и Пејеровим плочама) и повећањем заступљености активираних дендритских ћелија (у мезентеричном лимфном чвору).

У петом делу кандидаткиња износи резултате експеримената у којима је испитивано дејство оралног претретмана ВЕПА у моделу меланома. ВЕПА одлаже појаву меланома, делује на ћелије имунског система да мигрирају у туморско микроокружење и продукују IFN- γ , повећава продукцију овог проинфламацијског цитокина у лимфном ткиву црева, слезини и серуму. Резултат који кандидаткиња износи у следећем делу говори о значају проинфламацијског цитокина IFN- γ у појачаном антитуморском одговору животиња које су примиле ВЕПА. Наиме, услед примене неутралишућег антитела за IFN- γ , цитотоксичност спленоцита пореклом из животиња претретираних ВЕПА смањена на ниво цитотоксичности спленоцита пореклом из контролних животиња. На крају, ВЕПА не делује цитотоксично на ћелије B16 меланома, што иде у прилог да ВЕПА своје дејство у

моделу меланома остварује делујући на имунски систем.

Поглавље **Дискусија** кандидаткиња започиње рекапитулацијом добијених резултата. Затим, детаљно дискутује о значају добијених резултата, у светлу познатих чињеница. Разматрање започиње делом посвећеним садржају фенолних једињења у ВЕПА и дискутује о могућим кандидатима за уочене проинфламацијске ефекте ВЕПА у здравих животиња. Потом наводи литературно познате проинфламацијске и антиинфламацијске ефекте како црне ароније, тако и других биљних екстраката. Такође објашњава уочене ефекте ВЕПА на нивоу имунског система црева, као првом месту у организму где ВЕПА може деловати, као и на нивоу слезине, као одраз системског деловања ВЕПА. У следећем делу дискутује резултате добијене у моделу инфекције. Овде дискутује о повећаној фагоцитној способности мијелоидних ћелија и повећаној продукцији азот-моноксида, као најзначајнијих за остварене протективне ефекте ВЕПА. Указује на литературне податке о екстрактима и компонентама који доводе до оваквих, али и супротних ефеката. Дискусија о резултатима добијеним у моделу меланома почиње навођењем литературних података о антипролиферативним и проапоптотским дејствима различитих биљних екстраката у моделу меланома, потом и о документованим имуномодулацијским ефектима екстраката. Наставља навођењем медијатора имунског система који су значајни за антитуморски одговор, са посебним акцентом на IFN- γ , чијем деловању је приписан део антитуморског ефекта ВЕПА. Дискусију завршава адекватним закључним поглављем у коме укратко, али довољно садржајно апострофира значај кључних резултата добијених у дисертацији за разумевање деловања ВЕПА на имунски систем здравих мишева, као и у моделима инфекције и меланома. Свака од продискутованих целина је праћена графичким приказом резултата.

Закључци докторске дисертације су наведени тако да су у потпуности комплементарни постављеним циљевима. Дати су конкретни закључци о утицају и механизмима којима ВЕПА делује на ћелије урођене и стечене имуности *in vitro* и *in vivo*, као и у моделима инфекције и меланома. На крају је дат општи закључак да ВЕПА делује на ћелије имунског система да ефикасније одреагују на унутарћелијске бактерије и да ефикасније одреагују против трансформисаних ћелија.

У поглављу **Литература** са 238 библиографских јединица које су релевантне по избору и броју, уз навођење адекватних литературних података, види се кандидаткињин студиозан приступ проблематици.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Gajić D**, Stojanović I, Koprivica I, Pejnović N, Šavikin K, Ćujić-Nikolić N, Saksida T. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract abrogates melanoma progression through boosting up IFN- γ -producing cells. J Funct Foods, August 2022, doi: 10.1016/j.jff.2022.105185. **M21 категорија**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464622002559>

2. **Gajić D**, Saksida T, Koprivica I, Vujičić M, Despotović S, Šavikin K, Janković T, Stojanović I. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract modulates immune response *in vivo* and *in vitro*. J Funct Foods, March 2020, doi: 10.1016/j.jff.2020.103836. **M21 категорија**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464620300608>

3. **Gajić D**, Saksida T, Koprivica I, Šenerović L, Morić I, Šavikin K, Menković N, Pejnović N, Stojanović I. Immunomodulatory activity and protective effects of chokeberry fruit extract on *Listeria monocytogenes* infection in mice. Food Funct. 2020 Sep 23;11(9):7793-7803. doi: 10.1039/d0fo00946f. **M21 категорија**

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/FO/D0FO00946F>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **Gajić D**, Saksida T, Koprivica I, Vujičić M, Despotović S, Šavikin K, Janković T, Stojanović I. Aronia berries fruit water extract stimulates cells of the immune system *in vitro* and *in vivo*. Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches, Belgrade, Serbia, December 6.-8. 2019. Abstract book, p130.

2. **Gajić D**, Saksida T, Koprivica I, Vujičić M, Despotović S, Šavikin K, Janković T, Stojanović I. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract modulates mouse immune response in vitro and in vivo. Serbian Biochemical Society 9th Conference "Diversity in Biochemistry" (2019), Belgrade, Serbia, Proceedings, p96.
3. **Gajić D**, Saksida T, Koprivica I, Vujičić M, Šavikin K, Šenerović L, Despotović S, Pejnović N, Stojanović I. Uticaj vodenog ekstrakta ploda aronije na imunski sistem u mišjim modelima infekcije i tumora. Svetski dan imunologije u SANU, 2021, Beograd, Srbija, Knjiga apstrakata.
4. **Mićanović D**, Koprivica I, Šavikin K, Šenerović L, Despotović S, Pejnović N, Stojanović I, Saksida T. Effects of chokeberry fruit water extract on immune system in mouse models of infection and melanoma. Serbian Biochemical Society 9th Conference "Amazing Biochemistry" (2022), Novi Sad, Serbia, Proceedings, p98.

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидата Драгице М. Мићановић број индекса: Б3016/2017 је дана 14.12.2022. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 15.12.2022. године. На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Утицај воденог ekstrakta плода ароније на имунски систем у мишјим моделима инфекције и меланома”, аутора Драгице М. Мићановић, констатујем да утврђено подударане текста износи укупно 17%. Овај степен подударности последица је личних имена ментора и комисије, афилијација комисије и аутора, библиографских података о коришћеној литератури, а пре свега општих ревијских радова који се често цитирају, општих места и података, као што су скраћенице и пуни

називи молекула и ћелија, назива гена, протеина, биолошких врста, описа експерименталних процедура у поглављу Материјал и методе које се користе у групи у којој аутор ради и које се описују на идентичан, прецизан и јасан начин како би испуниле основну намену: могућност њиховог пуног разумевања и извођења од стране других истраживача, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Анализа докторске дисертације кандидаткиње **Драгице М. Мићановић** под насловом **„Утицај воденог екстракта плода ароније на имунски систем у мишјим моделима инфекције и меланома“** показује да је кандидаткиња у својој докторској дисертацији успешно реализовала постављене циљеве истраживања кроз свеобухватан и изузетно конципиран експериментални рад. Докторска дисертација представља оригиналан научни рад у области имунологије који истражује улогу ВЕПА у модулацији одговора имунског система, кроз испитивање дејства ВЕПА на ћелије имунског у здравих мишева, као и у експерименталним моделима инфекције и меланома. Дакле, резултати добијени у овој дисертацији имају базични значај јер доприносе разумевању имуномодулацијских

карактеристика ВЕПА, али и применљивост јер указују да би модулација имунског одговора путем ВЕПА могла бити коришћена у терапији инфекција унутарћелијским бактеријама и у терапији меланома. Обзиром на то да постоји пораст отпорности на антибиотике и да терапија меланома има доста нежељених дејстава, налази ове докторске дисертације су од значаја за напредак истраживања у циљу проналажења потенцијалних терапијских приступа. Наиме, резултати ове дисертације говоре о дејству оралног уноса ВЕПА на ћелије имунског система у цревима, а које своје ефекторске функције могу остварити на удаљеним местима, као што је то случај у слезини приликом одговора на унутарћелијску бактерију, или у туморској микроколини. Стога су резултати ове тезе од значаја за проучавање могућности модулације антибактеријског и антитуморског имунског одговора. Такође указују да су смислена даља истраживања биљних екстраката за терапију стања нарушеног имунског одговора.

Самосталност у планирању и експерименталној реализацији истраживања, као и у тумачењу и критичком разматрању резултата које је кандидаткиња у раду на овој дисертацији показала, говоре о добром познавању научне области којој обрађена проблематика припада. Као резултат, истраживања приказана у овој дисертацији су публикована у три научна рада М21 категорије у којима је кандидаткиња први аутор. Поред ових радова, кандидаткиња је коаутор још 9 радова из области имунологије, од тога је у два рада први аутор. Комисија са задовољством констатује да је имала прилику да анализира вредан и оригиналан научни допринос младе истраживачице.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације кандидаткиње Драгице М. Мићановић под насловом „Утицај воденог екстракта плода ароније на имунски систем у мишијим моделима инфекције и меланома“ укључујући допринос ове дисертације разумевању функционисања имунског система, применљивост њених резултата за даља истраживања у области имунологије, испољену самосталност и друге личне квалитете кандидаткиње, као и адекватну библиографију, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај реферат и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидаткиње Драгице М. Мићановић.

КОМИСИЈА:

У Београду, 19.12.2022. године.

др Ивана Стојановић, научни саветник,
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић” -
Институт од националног значаја за Републику Србију
Универзитет у Београду

др Катарина Митић, виши научни сарадник,
Биолошки факултет
Универзитет у Београду

др Катарина Шавикин, научни саветник,
Институт за проучавање лековитог биља
„Др Јосиф Панчић“