**ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ**
**УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ** **ОБРАЗАЦ - Д 3**
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE FORM - D3
UNIVERSITY OF BELGRADE

# ИЗВЕШТАЈ О НАУЧНОЈ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ И ПОДОБНОСТИ КАНДИДАТА ЗА ИЗРАДУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

*REPORT ON THE SCIENTIFIC BASIS OF THE DOCTORAL DISSERTATION TOPIC AND CANDIDATE COMPETENCIES FOR WORK ON THE DOCTORAL DISSERTATION*

## I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:

*I INFORMATION ABOUT THE COMMISSION*

**1. Датум и назив органа који је именовао комисију:**

*1. The date and the institution body that appointed the commission:*

08. 07. 2026. године

Наставно-научно веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду
*Teaching and Scientific Council, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade*

**2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, године избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

*2. Members of the Commission with the first and last names of each member; position, the scientific field for which members were appointed, the year of election and the name of faculty, and institution in which the member of the commission is employed.*

Др Дејан Крњаић, редовни професор, Микробиологија са имунологијом, 2016., Катедра за микробиологију,Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

*Dejan Krnjaić PhD, Full Professor, Microbiology with Immunology, 2016., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade.*

Др Наташа Голић, научни саветник, Молекуларна микробиологија, 2013., Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (ИМГГИ), Универзитет у Београду, Србија

*Nataša Golić PhD, Full Research Professor, Molecular biology, 2013., Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE), University of Belgrade, Serbia*

Др Сара Пансери, ванредни професор, Безбедност хране, 2023., Департман за ветеринарску медицину, Универзитет у Милану, Италија.

*Sara Panseri PhD, Associate Professor, Food Safety, 2023., Department of Veterinary Medicine and Animal Science (DIVAS) University of Milan, Italy.*

## II МЕНТОР КОЈИ СЕ ПРЕДЛАЖЕ И ОЦЕНА ПОДОБНОСТИ ПРЕДЛОЖЕНОГ МЕНТОРА (навести списак изабраних радова са категоризацијом, највише до 10 радова):

*II PROPOSAL AND ASSESSMENT OF THE PROPOSED MENTOR'S COMPETENCIES (specify a list of published scientific papers with the categorization, up to 10 papers)*

Др Радослава Савић Радовановић, редовни професор, специјалиста ветеринарске клиничке микробиологије, Хигијена и технологија млека, 2026, Катедра за хигијену и технологију намирница анималног порекла, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Србија (Ментор 1).

*Radoslava Savić Radovanović PhD, Full Professor, specialist in veterinary clinical microbiology, Milk hygiene and technology, 2026, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Serbia (Mentor 1)*

1. Sikimić P, Zdravković N, Aleksić B, Šefer D, Dimitrijević V, **Savić Radovanović R**. Isolation and characterization of lactobacilli isolates from canine (Canis familiaris) milk. in Acta Veterinaria-Beograd. 2025;75(1):50-62. doi:10.2478/acve-2025-0005 .
2. Biljana Aleksic, Ilija Djekic, Jelena Miocinovic, Zorana Miloradovic, **Radoslava Savic Radovanovic**, Nemanja Zdravkovic, Nada Smigic, 2023, The hygienic assessment of dairy products' selling places at open markets, *Food Control*, Vo 148, 109628,ISSN 0956-7135, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109628. [IF=5, 6].
3. **Savic Radovanovic Radoslava**, Natasa Rajic Savic, Lazar Ranin, Aleksandra Smitran, Natasa Vuckovic Opavski, Andreja Milosavljevic Tepavcevic, Jovana Ranin, Ina Gajic, 2020, Biofilm Production and Antimicrobial Resistance of Clinical and Food Isolates of *Pseudomonas* spp.,*Current Microbiology*, Vol 77, 4045–4052. [IF=2,188].
4. **Savić Radovanović Radoslava**, Zdravković Nemanja, Velebit Branko, 2020, Occurrence and characterization of enterotoxigenic staphylococci isolated from soft cheeses in Serbia, *Acta Veterinaria-Beograd*, 70 (2), pp. 238-254. UDK: 637.3.065:579.86 579.67 DOI: 10.2478/acve-2020-0017 [IF=0,800].
5. Vidaković Knežević Suzana, Kocić-Tanackov Sunčica, Kravić, Slobodan Knežević Snežana, Vranešević Jelena, **Savić Radovanović Radoslava**, Karabasil Nedjeljko, 2021,*In vitro* antibacterial activity of some essential oils against *Salmonella* Enteritidis *and Salmonella* Typhimurium isolated from meat, Journal of Food Safety and Quality, 72, Heft 1, 1-34. [IF=0,308].
6. Bulajić Snežana, Čolović Svetlana, Mišić Dušan, Đorđević Jasna, **Savić Radovanović Radoslava,** Ašanin Jelena, Ledina Tijana, 2017, Enterotoxin production and antimicrobial susceptibility in Staphylococci isolated from traditional raw milk cheeses in Serbia, *Journal of Environmental Science and Health, Part B, Practices, Food Contaminants and Agricultural Wastes,* 52 (12): 864-870. doi: 10.1080/03601234.2017.[IF=1,273].
7. Babić Milijana, Glišić Milica, Đorđević Jasna, Zdravković Nemanja, **Savić Radovanović Radoslava**, Baltić MIan., Bošković Cabrol Marija, 2021, Anti-staphylococcal effect of cinnamaldehyde in milk, *Italian Journal of Food Science,* 33(2): 108–116. DOI: 10.15586/ijfs.v33i2.1976. [IF=1,021].
8. **Savić Radovanović Radoslava**, Vera Katić, 2009, Influence of Lactic Acid Bacteria on *Staphylococcus aureus* in skimmed milk, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15 (3), 196-203. [IF=0,153].
9. Karabasil N, Teodorović V, Dimitrijević Mirjana, Pavlićević Nataša, Kureljušić Jasna, Đurić Spomenka, Sočo I, **Savić Radovanović Radoslava**, 2013, Behavior of *Salmonella* Typhimurium in pork meat and pork skin at different storage temperatures, *Acta Veterinaria- Beograd*, 63 (5-6), 655-663. [IF=0,258].
10. Marija Kovandžić, Štefan Pintarič, Jasna Đorđević, Tijana Ledina, **Radoslava Savić Radovanović**, Nikola Čobanović, 2024, On-farm welfare conditions of dairy donkeys: A case study in Northern Serbia, *Meat Technology* 65, 2, 146–153. ttps://doi.org/10.18485/meattech.2024.65.2.8 (M-24), 11.

Др Никола Поповић, виши научни сарадник, Молекуларна биологија, 2024, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (ИМГГИ) Универзитет у Београду, Србија (Ментор 2)

*Nikola Popović PhD, Associate Research Professor, 2024, Institute of molecular genetic and genetic engineering (IMGGE), University of Belgrade, Serbia (Mentor 2)*

1. **Popović Nikola**, Veljovic Katarina, Radojevic, Dusan Brdarić, Emilija Stevanović, Dušan Zivkovic, Milica Kojic Milan, 2024, Insight into the Probiogenomic Potential of *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 and Application of a Potent Thermostable Bacteriocin. *Foods*, 13. 2637. 10.3390/foods13162637.
2. **Popović Nikola**, Stevanović Dušan, Radojevic Dusan, Veljovic Katarina, Djokic Jelena, Golić Natasa, Terzic-Vidojevic Amarela, 2023, Insight into the Postbiotic Potential of the Autochthonous Bacteriocin-Producing *Enterococcus faecium* BGZLM1-5 in the Reduction in the Abundance of *Listeria monocytogenes* ATCC19111 in a Milk Model. *Microorganisms,* 11. 2844. 10.3390/microorganisms 11122844.
3. Dinic Miroslav, Jakovljevic Stefan, **Popović Nikola**, Radojevic Dusan, Veljovic Katarina, Golić Natasa, Terzic-Vidojevic Amarela, 2023, Assessment of stability and bioactive compounds in yogurt containing novel natural starter cultures with the ability to promote longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Dairy Science*. 106. 10.3168/jds.2023-23342.
4. Stankovic Marija, Veljovic Katarina, **Popovic Nikola**, Kojic Snezana, Dunjic Sofija, Radojkovic Dragica, Golić Natasa, 2022, *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 and *Lb. plantarum* BGPKM22 Exhibit Anti-Inflammatory Effect by Attenuation of NF-κB and MAPK Signaling in Human Bronchial Epithelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 23. 5547. 10.3390/ijms23105547.
5. **Popović Nikola**, Brdarić Emilija, Đokić Jelena, Dinić Miroslav, Veljović Katarina, Golić Nataša,Terzić-Vidojević Amarela, 2020. Yogurt produced by novel natural starter cultures improves gut epithelial barrier *in vitro*. *Microorganisms*, 8(10), 1586.
6. Sokovic Svetlana, Djokic Jelena, Dinic Miroslav, Tomic Sergej, **Popović Nikola**, Brdarić Emilija, Golić Natasa, Tolinacki Maja, 2020, GABA potentiate the immunoregulatory effects of *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 via ATG5-dependent autophagy *in vitro*. *Scientific Reports*. 10. 10.1038/s41598-020-58177-2.
7. **Popović Nikola**, Djokić Jelena, Brdarić Emilija, Dinić Miroslav, Terzić-Vidojević Amarela, Golić Nataša, Veljović Katarina, 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.
8. **Popović Nikola**, Dinic Miroslav, Tolinacki Maja, Mihajlovic Sanja, Terzic-Vidojevic Amarela, Bojic Svetlana, Djokic Jelena, Golić Natasa, Veljovic Katarina, 2018, New Insight into Biofilm Formation Ability, the Presence of Virulence Genes and Probiotic Potential of *Enterococcus* sp. Dairy Isolates. *Frontiers in Microbiology*. 9. 10.3389/fmicb.2018.00078.
9. Babic Mirjana, Veljovic Katarina, **Popović Nikola**, Golic Nataša, Radojkovic Dragica, & Stankovic Marija, 2023, Antioxidant effect of lactic acid bacteria in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke. *Journal of Applied Microbiology*, *134*(11), lxad257.
10. Tomić Jelen, Dapčević-Hadnađev Tamara, Škrobot Dubravka, Maravić Nikola, **Popović Nikola**, Stevanović Dušan, & Hadnađev, Miroslav, 2023, Spontaneously fermented ancient wheat sourdoughs in breadmaking: Impact of flour quality on sourdough and bread physico-chemical properties. *LWT*, 175, 114482.

**III ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ**:
*III CANDIDATE'S DATA:*

**1. Име, име једног родитеља, презиме:**
*Name, parent's name, family name:*
Милан (Мирослав) Богдановић
*Milan (Miroslav) Bogdanović*

**2**. **Датум и место рођења, општина, република:**
*2. Date and place of birth, Municipality, State*:
07.10.1985. године, Ваљево, Србија
*October, 7th 1985, Valjevo, Serbia*

**3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе ***

*3. Date and place of defence and the title of the Master's thesis **

-

**4**. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука *:**

*4. Scientific field in which the academic title of Master of Science is acquired **:

-

**IV ОБРАЗЛОЖЕНИ КРИТЕРИЈУМИ И РАЗЛОЗИ НА ОСНОВУ КОЈИХ СЕ ЗАСНИВА ПОЗИТИВНА ОЦЕНА ДА ЈЕ КАНДИДАТ ПОДОБАН ДА РАДИ ДИСЕРТАЦИЈУ (школовање, стипендије, радна биографија, учешће у пројектима, приказ научних и стручних радова са категоризацијом)**:

*IV EXPLAINED CRITERIA AND REASONS ON WHICH POSITIVE ASSESSMENT OF CANDIDATE'S CAPABILITY FOR WORK ON DISSERTATION IS BASED (education,scholarships, work, participation in projects, list of published scientific papers with the categorization):*

**Образовање**

*Education*

Милан М. Богдановић је 2004. године завршио Пољопривредну школу са домом ученика „Ваљево" у Ваљеву, смер ветеринарски техничар, као ђак генерације школске 2003/2004. године. За изузетан успех у средњошколском образовању додељена му је Похвалница Краљевског дома Карађорђевића. Школске 2004/2005. године уписао је основне академске и интегрисане мастер студије у обиму од 300 ЕСПБ бодова на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Наведене студије привео је крају 21. маја 2012. године одбраном дипломског рада под насловом „Хируршки третман и поткивање при постојању различитих облика пододерматитиса" на Катедри за хирургију, ортопедију и офталмологију, Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду чиме је стекао звање доктора ветеринарске медицине. Докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду уписао је школске 2012/2013. године, а након поновног уписа у школску 2025/2026. годину наставља исте.

*Milan M. Bogdanović completed his secondary education in 2004 at the Agricultural Boarding School "Valjevo" in Valjevo, in the Veterinary Technician programme, as the best student of the 2003/2004 graduating class. In recognition of his outstanding achievement in secondary education, he was awarded a Commendation by the Royal House of Karađorđević. In the 2004/2005 academic year, he enrolled in the undergraduate academic and integrated master's studies, the 300-ECTS study programme at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade. He completed on 21 May 2012 by defending his graduation thesis entitled "Surgical Treatment and Shoeing in Cases of Different Forms of Pododermatitis" at the Department of Surgery, Orthopaedics and Ophthalmology, at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, thereby obtaining the professional title of Doctor of Veterinary Medicine. He enrolled in doctoral academic studies at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, in the* 2012/2013 academic year and continued his studies after re-enrolling for the 2025/2026 academic year.

**Радна биографија**

*Employment*

По завршетку студија обавио је једногодишњи приправнички стаж у ПВС „Ветеринарски центар Ваљево" у Ваљеву. Од 1. септембра 2013. до 3. августа 2020. године радио је у Пољопривредној школи са домом ученика „Ваљево" у Ваљеву као наставник групе предмета ветеринарске струке. Током рада у образовању, на Универзитету Сингидунум, Пословном факултету „Ваљево", завршио је програм из психолошких, педагошких и методичких дисциплина у обиму од 30 ЕСПБ бодова, као и 6 ЕСПБ бодова практичног

рада у образовној установи. Пред комисијом Министарства просвете, науке и технолошког развоја положио је испит за дозволу за рад наставника, васпитача и стручних сарадника, чиме је стекао право на самостално обављање образовно-васпитног рада. Стручни испит за докторе ветеринарске медицине положио је пред испитном комисијом Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине, након чега му је Ветеринарска комора Србије издала лиценцу за обављање ветеринарске делатности. У истом периоду стручно се усавршавао у земљи и иностранству. Године 2016. похађао је курс из основа стоматологије и максилофацијалне хирургије коња на Клиници за коње у Гросвалштату у Немачкој(. Учествовао је и на Првој источноевропској ветеринарској конференцији (*1st Eastern European Veterinary Conference*) у Београду, као и на стручним и научним скуповима посвећеним заштити агробиодиверзитета и очувању аутохтоних раса домаћих животиња. Од 2020. године запослен је као ветеринарски инспектор у Управи за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде. Најпре је радио у Групи за контролу и безбедност намирница и споредних производа животињског порекла, а потом у Одсеку за контролу у извозним објектима. Тренутно ради у Групи за подршку у инспекцијском надзору, на радном месту ветеринарског инспектора у звању самосталног саветника. Пред испитним комисијама Министарства државне управе и локалне самоуправе положио је државни стручни испит за рад у државном органу и испит за инспектора.Током професионалне каријере похађао је бројна стручна усавршавања, међу којима се издвајају обука EuFMD у организацији Организације Уједињених нација за храну и пољопривреду — FAO, као и обуке у оквиру програма *Better Training for Safer Food* — BTSF, у организацији Европске комисије. У оквиру истраживања за докторску дисертацију учествовао је у експерименталном раду на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, под руководством др Николе Поповића. Део истраживања реализовао је током истраживачког боравка на Департману за ветеринарску медицину (DIVAS) Универзитета у Милану, у оквиру међународне научноистраживачке сарадње и под руководством проф. др Саре Пансери. Као аутор и коаутор објавио је радове који одражавају постепени развој његових истраживачких интересовања, од проучавања здравствених и физиолошких особености аутохтоних популација домаћих животиња до истраживања млека минорних млечних врста и функционалних својстава намирница животињског порекла.

*Following graduation, he completed a one-year veterinary internship at the Private Veterinary Station “Veterinary Centre Valjevo” in Valjevo.From 1 September 2013 to 3 August 2020, he worked at the Agricultural Boarding School “Valjevo” in Valjevo as a teacher of a group of vocational veterinary subjects.During his employment in education, he completed a programme in psychological, pedagogical and methodological disciplines at Singidunum University, Faculty of Business in Valjevo, comprising 30 ECTS credits and an additional 6 ECTS credits of practical work in an educational institution. He passed the examination for a teaching licence before a commission of the Ministry of Education, Science and Technological Development, thereby acquiring the right to perform educational work independently. He also passed the professional examination for Doctors of Veterinary Medicine before the Examination Commission of the Veterinary Directorate of the Ministry of Agriculture and Environmental Protection, after which the Veterinary Chamber of Serbia issued him a licence to practise veterinary medicine.During the same period, he continued his professional development in Serbia and abroad. In 2016, he attended a course in the fundamentals of equine dentistry and maxillofacial surgery at the Equine Clinic in Großwallstadt, Germany. He also participated in the First Eastern European Veterinary Conference in Belgrade, as well as in professional and scientific meetings dedicated to the protection of agrobiodiversity and the conservation of autochthonous domestic animal breeds.Since 2020, he has been employed as a Veterinary Inspector at the Veterinary Directorate of the Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management. He initially worked in the Group for the Control and Safety of Foodstuffs and Animal By-products and subsequently in the Section for Control in Export Establishments. He currently works in the Inspection Supervision Support Group as a Veterinary Inspector holding the civil service rank of Senior Adviser. Before the examination commissions of the Ministry of Public Administration and Local Self-Government, he passed the State Professional Examination for employment in a state authority and the examination for inspectors.Throughout his professional career, he has attended numerous professional*

*training programmes, among which the most notable are EuFMD training organised by the Food and Agriculture Organization of the United Nations — FAO, and training courses within the European Commission's Better Training for Safer Food — BTSF programme.As part of his doctoral dissertation research, he participated in experimental work at the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, under the supervision of Dr Nikola Popović. He conducted part of the research during a research stay at the Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences — DIVAS, University of Milan, within the framework of international scientific cooperation and under the supervision of Prof. Dr Sara Panseri. As an author and co-author, he has published papers reflecting the gradual development of his research interests, from the study of the health and physiological characteristics of autochthonous populations of domestic animals to research on milk from minor dairy species and the functional properties of foods of animal origin.*

**Приказ научних и стручних радова са категоризацијом**

*List of published scientific and professional papers with categorisation*

**Саопштења са скупова националног значаја штампана у целини (М63)**

Reports from the national meetings (M63)

1. **Bogdanović M**, Ivanov S, Pajić K, Kureljušić J, Pajić M, Trailović R, Savić Radovanić R : Uporedna analiza mleka ekvida. Zbornik radova V Simpozijuma Zaštita agrobiodiverziteta i očuvanje autohtonih rasa domaćih životinja, Dimitrovgrad, 19-21.jun 2025, Srpsko veterinarsko društvo, 125 -133.
2. Ivanov S, **Bogdanović M**: Muža balkanskih magarica i proizvodnja mleka magarica u Srbiji – stanje i perspektive. Zbornik predavanja trećeg simpozijuma Zaštita agrobiodiverziteta i očuvanje autohtonih rasa domaćih životinja, Dimitrovgrad, 25. – 27. jun 2021, Srpsko veterinarsko društvo, 409 - 417.
3. Lončina J, Ledina T, **Bogdanović M**, Bulajić S: Tehnologija obrade i prerade mleka magarica – mogućnosti i izazovi. Zbornik predavanja trećeg simpozijuma Zaštita agrobiodiverziteta i očuvanje autohtonih rasa domaćih životinja, Dimitrovgrad, 25. – 27. jun 2021, Srpsko veterinarsko društvo, 428 – 429 .
4. **Bogdanović M**, Marković L, Sabljić Lj, Đoković S, Kovačević Filipović M, Trailović: Stringhalt – idiopatska hiperfleksija skočnog zgloba kod balkanskog magarca na Staroj Planini. Zbornik radova Zaštita agrobiodiverziteta i očuvanje autohtonih rasa domaćih životinja, Dimitrovgrad, 28. – 30. jun 2019, Fakultet veterinarske medicine Beograd, 263 – 267.
5. **Bogdanović M**, Marković L, Sabljić Lj, Đoković S, Kovačević Filipović M, Trailović: Uticaj fizičkog opterećenja na hematološke parametre domaćih brdskih konja. Zbornik radova Zaštita agrobiodiverziteta i očuvanje autohtonih rasa domaćih životinja, Dimitrovgrad, 28. – 30. jun 2019, Fakultet veterinarske medicine Beograd, 246 – 250.
6. Sabljić Lj, Rosić Z, Marković L, **Bogdanović M**, Đoković S, Trailović D: Trovanje konja pirolizidinskim alkaloidima – mogući uzrok hroničnih hepatopatija i slabije telesne kondicije domaćih brdskih konja na pašnjacima Stare Planine. Zbornik radova Zaštita agrobiodiverziteta i očuvanje autohtonih rasa domaćih životinja, Dimitrovgrad, 28. – 30. jun 2019, Fakultet veterinarske medicine Beograd, 258 – 262.

**V ОЦЕНА ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ:**

1. **Наслов дисертације**:

1. *Dissertation title:*

**„Функционални ефекти и метаболомски профил дигестованог млека аутохтоних раса магарица и оваца у *in vitro* моделу "**

**„** *Functional effects and metabolomic profile of digested milk from autochthonous donkey and sheep breeds in an in vitro model* **"**

2. **Предмет истраживања (без литаратурних навода, до 700 речи):**

2. *Description of the research subject (no citations, up to 700 words):*

Предмет овог истраживања су млеко балканске магарице и овчије млеко белог метохијског соја праменке, као сложене биолошке матрице и природни извори биоактивни компоненти, чији се функционални потенцијал сагледава након *in vitro*

дигестије. Наведене аутохтоне расе представљају значајне генетичке ресурсе националног агробиодиверзитета Републике Србије и део су културног и нематеријалног наслеђа. Имајући у виду њихов угрожен статус, ове расе су укључене у национални програм заштите и очувања генетичких ресурса. Млеко магарице и овчије млеко припадају различитим типовима млека и одликују се специфичним физичко-хемијским, нутритивним и технолошким карактеристикама. Изражена фракција протеина млечног серума сврстава млеко магарице у албумински тип млека, док доминатно присуство казеинске фракције и висок садржај суве материје сврставају овчије млеко у казеински тип. Разлике у саставу и структури ових млечних матрица могу утицати на њихово понашање током дигестије, на састав добијених дигестата, њихов антимикробни потенцијал и могуће биолошке ефекте. Истраживање ће обухватити испитивање млека магарице, овчијег млека и њихових комбинација у различитим запреминским односима. Узорци ће бити подвргнути *in vitro* дигестији у симулираним условима гастроинтестиналног тракта, са циљем добијања дигестата који ће бити коришћени у даљим функционалним, молекуларно-биолошким и метаболомским испитивањима. У добијеним дигестатима биће испитани протеински профил и антимикробни потенцијал према одабраним цревним патогенима од значаја за безбедност хране. Функционални ефекти дигестата биће испитани на моделу диференцираних хуманих интестиналних епителних Caco-2 ћелија. Најпре ће бити процењена цитотоксичност добијених дигестата, након чега ће нецитотоксични третмани бити коришћени за испитивање њиховог утицаја на интегритет интестиналног епитела, мукозну заштиту, урођене механизме одбране и процесе аутофагије. Наведени ефекти биће процењени на нивоу експресије одабраних гена и заступљености одговарајућих протеинских маркера повезаних са интегритетом епителне баријере, антимикробном одбраном, мукозном заштитом и аутофагијом. Истраживање ће обухватити и анализу метаболомског профила дигестата млека магарице, овчијег млека и њихових комбинација, ради идентификације метаболита који могу бити повезани са испитиваним функционалним одговором интестиналних ћелија. Посебна пажња биће усмерена на процену утицаја различитих односа млека магарице и овчијег млека на функционални одговор Caco-2 ћелија и метаболомски профил добијених дигестата. На овај начин истраживање ће омогућити целовитије сагледавање функционалног потенцијала млека аутохтоних раса и процену могућности примене испитиваних млечних матрица у развоју функционалних производа од млека.

*The subject of this research is Balkan donkey milk and sheep milk from the White Metohija strain of Pramenka, considered as complex biological matrices and natural sources of bioactive components whose functional potential will be assessed following in vitro digestion. These autochthonous breeds represent important genetic resources of the national agrobiodiversity of the Republic of Serbia and form part of its cultural and intangible heritage. Given their endangered status, these breeds are included in the national programme for the protection and conservation of genetic resources. Donkey milk and sheep milk belong to different milk types and are characterised by specific physicochemical, nutritional and technological properties. The pronounced whey protein fraction classifies donkey milk as an albumin-type milk, whereas the high total solids content and the dominant presence of the casein fraction classify sheep milk as a casein-type milk. Differences in the composition and structure of these milk matrices may influence their behaviour during digestion, the composition of the resulting digestates, their antimicrobial potential and their possible biological effects. The research will include the examination of donkey milk, sheep milk and their combinations in different volume ratios. The samples will be subjected to in vitro digestion under simulated gastrointestinal conditions in order to obtain digestates that will be used in further functional, molecular biological and metabolomic analyses. The protein profile and antimicrobial potential of the obtained digestates against selected intestinal pathogens relevant to food safety will be examined. The functional effects of the digestates will be investigated using a model of differentiated human intestinal epithelial Caco-2 cells. The cytotoxicity of the obtained digestates will first be assessed, after which non-cytotoxic treatments will be used to examine their effects on intestinal epithelial integrity, mucosal protection, innate defence mechanisms and autophagy processes. These effects will be assessed at the level of selected gene expression and the abundance of corresponding protein markers associated with epithelial barrier integrity, antimicrobial defence, mucosal protection and autophagy. The research will also include analysis of the metabolomic profiles*

*of digestates obtained from donkey milk, sheep milk and their combinations, with the aim of identifying metabolites that may be associated with the examined functional response of intestinal cells. Particular attention will be directed towards assessing the influence of different ratios of donkey milk and sheep milk on the functional response of Caco-2 cells and the metabolomic profiles of the obtained digestates. In this way, the research will enable a more comprehensive assessment of the functional potential of milk from autochthonous breeds and an evaluation of the possible application of the examined milk matrices in the development of functional dairy products.*

**3. Подаци из изабране литературе (са наводима из литературе приказаних у оквиру текста и списком референци коришћених у тексту, до 700 речи и до 10 референци):**

*3. Literature data (with quotes presented in the the text, up to 700 words and 10 references):*

Млеко има важно место у исхрани људи као извор основних хранљивих материја, али се у савременој литератури све више посматра и као сложена биолошка матрица. Такав приступ подразумева да се његова својства не тумаче само на основу присуства и количине појединачних нутријената, већ и кроз њихов међусобни однос, структурну организацију и интеракције у оквиру млечне матрице (Thorning и сар., 2017). Посебан значај имају промене које настају током гастроинтестиналне дигестије, када долази до разградње и трансформације протеина, липида и других компоненти млека и настанка дигестата различитог молекулског састава. Стандардизовани INFOGEST протокол омогућава контролисано симулирање оралне, желудачне и интестиналне фазе дигестије и упоредиво испитивање дигестованих узорака хране (Brodkorb и сар., 2019). Млеко магарице издваја се специфичним хемијским саставом који га разликује од млека преживара. Одликују га висок садржај лактозе, низак садржај млечне масти и укупних протеина, као и већа заступљеност протеина млечног серума у односу на казеинску фракцију, због чега припада албуминском типу млека (Salimei и Fantuz, 2012; Aspri и сар., 2017). Његов функционални потенцијал повезује се са специфичним протеинским профилом и присуством биолошки активних компоненти, док низак садржај суве материје и специфичне технолошке особине могу ограничити његову примену у појединим класичним поступцима прераде (Aspri и сар., 2017). Овчије млеко се, насупрот томе, одликује високим садржајем суве материје, млечне масти, протеина, казеина и минералних материја. Такав састав условљава његову изражену нутритивну и технолошку вредност и погодност за производњу сира и ферментисаних производа од млека (Balthazar и сар., 2017). Разлике у уделу казеина, протеина млечног серума, липида и других компоненти млека магарице и овчијег млека могу током гастроинтестиналне дигестије довести до настанка различитих профила пептида, аминокиселинских деривата, липидних деривата и других нискомолекуларних једињења. Стога је, поред састава сировог млека, за процену функционалног потенцијала ових млечних матрица важно испитати и састав и биолошко деловање насталих дигестата. Након дигестије, растворљиве компоненте и нискомолекуларни продукти разградње хране долазе у непосредан контакт са интестиналним епителом. Интестинална баријера истовремено омогућава апсорпцију хранљивих материја и ограничава продор патогена, токсина и других штетних молекула, због чега представља важно циљно место за процену функционалног одговора на компоненте хране и њихове дигестате (Suzuki, 2020). Диференциране Caco-2 ћелије широко се користе као *in vitro* модел интестиналног епитела и омогућавају контролисано испитивање параметара повезаних са интегритетом епителне баријере, урођеном антимикробном одбраном, аутофагијом и ћелијском хомеостазом (Popović и сар., 2020). Комбиновање млека магарице и овчијег млека може се посматрати као повезивање две различите и потенцијално комплементарне млечне матрице. Млеко магарице поседује нутритивно и биофункционално значајна својства, али има ограничену технолошку примену, док овчије млеко, захваљујући већем садржају суве материје и повољнијим технолошким својствима, може допринети формирању мешавина погоднијих за даљу прераду. Могућност примене млека магарице у формулисању производа од млека испитивана је и кроз процену његовог утицаја на технолошки поступак, микробиолошки квалитет, састав и сензорну прихватљивост производа (Vidaković Knežević и сар., 2025). Међутим,

подаци о утицају различитих односа млека магарице и овчијег млека на састав насталих дигестата и функционални одговор интестиналних ћелија и даље су ограничени. Метаболомско профилисање применом течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом омогућава свеобухватније сагледавање нискомолекуларних једињења, пептида, аминокиселинских и липидних деривата присутних у млеку и производима од млека (Zhang и сар., 2023; Imperiale и сар., 2023). Примена оваквог приступа на дигестате и повезивање њиховог метаболомског профила са функционалним одговором Caco-2 ћелија може допринети бољем разумевању односа између дигестивне трансформације различитих млечних матрица и њиховог потенцијалног деловања на интестинални епител.

*Milk occupies an important place in human nutrition as a source of essential nutrients, but contemporary literature increasingly considers it a complex biological matrix. This approach implies that its properties should not be interpreted solely on the basis of the presence and quantity of individual nutrients, but also through their interrelationships, structural organisation and interactions within the milk matrix (Thorning et al., 2017). Of particular importance are the changes occurring during gastrointestinal digestion, when proteins, lipids and other milk components are degraded and transformed, resulting in digestates with different molecular compositions. The standardised INFOGEST protocol enables controlled simulation of the oral, gastric and intestinal phases of digestion and comparative investigation of digested food samples (Brodkorb et al., 2019). Donkey milk is distinguished by its specific chemical composition, which differentiates it from ruminant milk. It is characterised by a high lactose content, low levels of milk fat and total protein, and a higher proportion of whey proteins relative to the casein fraction, which classifies it as an albumin-type milk (Salimei and Fantuz, 2012; Aspri et al., 2017). Its functional potential has been associated with its specific protein profile and the presence of biologically active components, whereas its low total solids content and specific technological properties may limit its application in certain conventional processing procedures (Aspri et al., 2017). In contrast, sheep milk is characterised by high contents of total solids, milk fat, protein, casein and minerals. This composition accounts for its pronounced nutritional and technological value and its suitability for cheese-making and the production of fermented dairy products (Balthazar et al., 2017). Differences in the proportions of caseins, whey proteins, lipids and other components of donkey milk and sheep milk may result in the formation of different profiles of peptides, amino acid derivatives, lipid derivatives and other low-molecular-weight compounds during gastrointestinal digestion. Therefore, in addition to the composition of raw milk, assessment of the functional potential of these milk matrices should also include examination of the composition and biological effects of the resulting digestates. Following digestion, soluble components and low-molecular-weight food degradation products come into direct contact with the intestinal epithelium. The intestinal barrier simultaneously enables nutrient absorption and restricts the passage of pathogens, toxins and other harmful molecules, which makes it an important target site for assessing functional responses to food components and their digestates (Suzuki, 2020). Differentiated Caco-2 cells are widely used as an* in vitro *model of the intestinal epithelium and enable the controlled investigation of parameters associated with epithelial barrier integrity, innate antimicrobial defence, autophagy and cellular homeostasis (Popović et al., 2020). Combining donkey milk and sheep milk may be viewed as the integration of two different and potentially complementary milk matrices. Donkey milk possesses nutritionally and biofunctionally relevant properties, but has limited technological applicability, whereas sheep milk, owing to its higher total solids content and more favourable technological properties, may contribute to the formation of mixtures more suitable for further processing. The potential application of donkey milk in the formulation of dairy products has also been investigated by assessing its influence on the technological process, microbiological quality, composition and sensory acceptability of the resulting products (Vidaković Knežević et al., 2025). However, data concerning the influence of different ratios of donkey milk and sheep milk on the composition of the resulting digestates and the functional response of intestinal cells remain limited. Metabolomic profiling using liquid chromatography coupled with mass spectrometry enables a more comprehensive assessment of low-molecular-weight compounds, peptides, amino acid derivatives and lipid derivatives present in milk and dairy products (Zhang et al., 2023; Imperiale et al., 2023). Applying this approach to digestates and linking their metabolomic profiles with the functional response of Caco-2 cells may contribute*

*to a better understanding of the relationship between the digestive transformation of different milk matrices and their potential effects on the intestinal epithelium.*

Списак референци коришћених у тексту:
*List of references in text:*


1. Thorning, T.K.; Bertram, H.C.; Bonjour, J.-P.; de Groot, L.; Dupont, D.; Feeney, E.; Ipsen, R.; Lecerf, J.-M.; Mackie, A.; McKinley, M.C.; et al. Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: Current evidence and knowledge gaps. *American Journal of Clinical Nutrition* 2017, **105**(5), 1033–1045. https://doi.org/10.3945/ajcn.116.151548
2. Brodkorb, A.; Egger, L.; Alminger, M.; Alvito, P.; Assunção, R.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu-Lacanal, C.; Boutrou, R.; Carrière, F.; et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 2019, **14**, 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1
3. Salimei, E.; Fantuz, F. Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal* 2012, **24**(2), 130–142. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.008
4. Aspri, M.; Economou, N.; Papademas, P. Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food Reviews International* 2017, **33**(3), 316–333. https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175014
5. Balthazar, C.F.; Pimentel, T.C.; Ferrão, L.L.; Almada, C.N.; Santillo, A.; Albenzio, M.; Mollakhalili, N.; Mortazavian, A.M.; Nascimento, J.S.; Silva, M.C.; et al. Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2017, **16**(2), 247–262. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250
6. Suzuki, T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal* 2020, **91**(1), e13357. https://doi.org/10.1111/asj.13357
7. Popović, N.; Brdarić, E.; Đokić, J.; Dinić, M.; Veljović, K.; Golić, N.; Terzić-Vidojević, A. Yogurt produced by novel natural starter cultures improves gut epithelial barrier *in vitro*. *Microorganisms* 2020, **8**(10), 1586. https://doi.org/10.3390/microorganisms8101586
8. Vidaković Knežević, S.; Vranešević, J.; Popov, N.; Knežević, S.; Ljubojević Pelić, D.; Živkov Baloš, M. Impact of Balkan and Banat donkey milk on the technological process, microbiological quality, composition, and consumer acceptability of rolled cheese. *Foods* 2025, **14**(12), 2041. https://doi.org/10.3390/foods14122041
9. Zhang, X.; Zheng, Y.; Liu, Z.; Su, M.; Cao, W.; Zhang, H. Review of the applications of metabolomics approaches in dairy science: From factory to human. *International Journal of Dairy Technology* 2023, **76**(3), 468–481. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12948
10. Imperiale, S.; Morozova, K.; Ferrentino, G.; Scampicchio, M. Analysis of milk with liquid chromatography–mass spectrometry: A review. *European Food Research and Technology* 2023, **249**, 861–902. https://doi.org/10.1007/s00217-022-04197-3


**4. Циљеви истраживања (описно):**
*4. Aims of the research (descriptively):*

Полазећи од две хипотезе:
**Хипотеза 1** – *In vitro* дигестовано млеко балканске магарице и овчије млеко белог метохијског соја праменке могу различито утицати на експресију гена повезаних са функцијом интестиналне баријере, урођеном одбраном и аутофагијом у диференцираним Caco-2 ћелијама.
**Хипотеза 2** – Различити односи млека балканске магарице и овчијег млека белог метохијског соја праменке, након симулиране гастроинтестиналне дигестије, могу довести до различитих метаболомских профила дигестата и изазвати функционалне одговоре у зависности од односа млека у диференцираним Caco-2 ћелијама.
Постављен је следећи циљ: да се испитају функционални ефекти и метаболомски профил млека балканске магарице, овчијег млека белог метохијског соја праменке и њихових комбинација након *in vitro* дигестије у симулираним условима гастроинтестиналног тракта, на моделу диференцираних хуманих интестиналних епителних Caco-2 ћелија. Додатно, истраживањем ће се проценити да ли се различити

удели млека магарице у комбинацији са овчијим млеком могу утицати на функционални одговор диференцираних хуманих интестиналних епителних Caco-2 ћелија и метаболомски профил добијених дигестата.

*Starting from two hypotheses:*

***Hypothesis 1*** *– Following in vitro digestion, Balkan donkey milk and sheep milk from the White Metohija strain of Pramenka may differentially affect the expression of genes associated with intestinal barrier function, innate defence and autophagy in differentiated Caco-2 cells.*

***Hypothesis 2*** *– Different ratios of Balkan donkey milk and sheep milk from the White Metohija strain of Pramenka, following simulated gastrointestinal digestion, may result in different metabolomic profiles of the digestates and induce ratio-dependent functional responses in differentiated Caco-2 cells.*

*The following research objective has been established: to examine the functional effects and metabolomic profiles of Balkan donkey milk, sheep milk from the White Metohija strain of Pramenka and their combinations following in vitro digestion under simulated gastrointestinal conditions, using a model of differentiated human intestinal epithelial Caco-2 cells.Additionally, the research will assess whether different proportions of donkey milk combined with sheep milk may affect the functional response of differentiated human intestinal epithelial Caco-2 cells and the metabolomic profiles of the obtained digestates.*

**5. Очекивани резултати** :
*5. Expected results:*

Очекује се да ће након *in vitro* дигестије млека балканске магарице, овчијег млека белог метохијског соја праменке и њихових комбинација настати дигестати који ће се разликовати по протеинском профилу, антимикробном потенцијалу и метаболомском саставу. Те разлике требало би да одражавају специфичности састава и структуре две млечне матрице, као и удео млека магарице и овчијег млека у испитиваним комбинацијама. Испитивањем цитотоксичности утврдиће се да ли је примењена концентрација дигестата погодна за даља испитивања на моделу диференцираних хуманих интестиналних епителних Caco-2 ћелија. Код третмана који не испоље цитотоксично дејство очекују се разлике у молекуларном и функционалном одговору ћелија, које ће бити процењене на основу експресије одабраних гена и заступљености одговарајућих протеинских маркера повезаних са интегритетом интестиналне баријере, мукозном заштитом, урођеним механизмима одбране и аутофагијом. Очекује се да ће одговор ћелија зависити од врсте млека и њеног запреминског удела у испитиваним комбинацијама. Метаболомским профилисањем утврдиће се разлике у заступљености и расподели детектованих метаболита између дигестата млека магарице, овчијег млека и њихових комбинација. На основу добијених профила биће издвојени метаболити или групе метаболита који би могли бити повезани са уоченим одговорима Caco-2 ћелија. Повезивање метаболомских налаза са молекуларним и функционалним одговорима ћелија омогућиће целовитије сагледавање односа између састава дигестата и одговора интестиналног епитела. Резултати истраживања требало би да допринесу бољем разумевању промена које настају током гастроинтестиналне дигестије млека аутохтоних раса и могућег деловања насталих дигестата на интестиналне епителне ћелије. Добијени резултати представљаће основу за даља истраживања и развој функционалних производа од млека који би објединили специфичне биолошке карактеристике млека магарице са нутритивним и технолошким својствима овчијег млека. Истраживање ће допринети и валоризацији балканске магарице и белог метохијског соја праменке, бољем препознавању њиховог значаја у производњи и научним истраживањима, као и очувању аутохтоних генетичких ресурса и агробиодиверзитета Републике Србије.

*It is expected that following* in vitro *digestion of Balkan donkey milk, sheep milk from the White Metohija strain of Pramenka and their combinations, digestates will be obtained that*

*differ in their protein profiles, antimicrobial potential and metabolomic composition. These differences should reflect the specific composition and structural characteristics of the two milk matrices, as well as the proportions of donkey milk and sheep milk in the examined combinations. Cytotoxicity testing will determine whether the applied digestate concentration is suitable for further studies using a model of differentiated human intestinal epithelial Caco-2 cells. For treatments that do not exhibit cytotoxic effects, differences in the molecular and functional responses of the cells are expected. These responses will be assessed on the basis of the expression of selected genes and the abundance of corresponding protein markers associated with intestinal barrier integrity, mucosal protection, innate defence mechanisms and autophagy. The cellular response is expected to depend on the type of milk and its volume proportion in the examined combinations.Metabolomic profiling will determine differences in the abundance and distribution of detected metabolites among donkey milk digestates, sheep milk digestates and digestates of their combinations. Based on the obtained profiles, metabolites or groups of metabolites that may be associated with the observed responses of Caco-2 cells will be identified. Linking the metabolomic findings with the molecular and functional responses of the cells will enable a more comprehensive understanding of the relationship between digestate composition and the response of the intestinal epithelium.The research results should contribute to a better understanding of the changes occurring during the gastrointestinal digestion of milk from autochthonous breeds and of the potential effects of the resulting digestates on intestinal epithelial cells.The obtained results will provide a basis for further research and the development of functional dairy products combining the specific biological characteristics of donkey milk with the nutritional and technological properties of sheep milk. The research will also contribute to the valorisation of the Balkan donkey and the White Metohija strain of Pramenka, to better recognition of their importance for production and scientific research, and to the conservation of autochthonous animal genetic resources and agrobiodiversity in the Republic of Serbia.*

**6. План истраживања (приказан у фазама):**

*6. Research plan (shown in phases):*

Истраживање ће бити спроведено у три међусобно повезане фазе, у складу са постављеним хипотезама и циљем истраживања.

*The research will be conducted in three interrelated phases, in accordance with the defined hypotheses and research objective.*

**Прва фаза**

У првој фази биће испитани функционални ефекти млека балканске магарице и овчијег млека белог метохијског соја праменке након *in vitro* дигестије у симулираним условима гастроинтестиналног тракта, на моделу диференцираних хуманих интестиналних епителних Caco-2 ћелија. У оквиру припремног дела ове фазе биће обављено узорковање млека, одређени основни параметри хемијског састава и процењен микробиолошки квалитет узорака. Појединачни узорци млека магарице и овчијег млека биће подвргнути стандардизованом протоколу *in vitro* дигестије, који обухвата оралну, желудачну и интестиналну фазу. Биће испитани протеински профил и антимикробни потенцијал добијених дигестата према одабраним патогенима значајним за безбедност хране.На моделу диференцираних Caco-2 ћелија најпре ће бити процењена цитотоксичност добијених дигестата. Третмани који не испоље цитотоксично дејство биће затим примењени ради испитивања функционалног одговора ћелија, који ће бити процењен на основу експресије одабраних гена и заступљености одговарајућих протеинских маркера повезаних са интегритетом интестиналне баријере, мукозном заштитом, урођеним механизмима одбране и процесима аутофагије.

***First phase***

*In the first phase, the functional effects of Balkan donkey milk and sheep milk from the White Metohija strain of Pramenka following in vitro digestion under simulated gastrointestinal*

*conditions will be examined using a model of differentiated human intestinal epithelial Caco-2 cells. As a preparatory part of this phase, milk sampling will be carried out, the basic parameters of chemical composition will be determined and the microbiological quality of the samples will be assessed. Individual samples of donkey milk and sheep milk will be subjected to a standardised in vitro digestion protocol comprising the oral, gastric and intestinal phases. The protein profiles and antimicrobial potential of the obtained digestates against selected pathogens relevant to food safety will be examined. The cytotoxicity of the obtained digestates will first be assessed using differentiated Caco-2 cells. Non-cytotoxic treatments will then be used to examine the functional cellular response, which will be evaluated on the basis of the expression of selected genes and the abundance of corresponding protein markers associated with intestinal barrier integrity, mucosal protection, innate defence mechanisms and autophagy processes.*

**Друга фаза**

У другој фази биће испитан функционални одговор диференцираних хуманих интестиналних епителних Caco-2 ћелија на дигестате добијене од различитих запреминских односа млека балканске магарице и овчијег млека белог метохијског соја праменке, након *in vitro* дигестије у симулираним условима гастроинтестиналног тракта. Узорци ће бити припремљени у односима млека магарице и овчијег млека 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 и 0:100. Сви узорци биће подвргнути истом протоколу гастроинтестиналне дигестије, чиме ће бити омогућено њихово непосредно поређење. Биће испитани протеински профил и антимикробни потенцијал добијених дигестата, а након процене цитотоксичности биће одабрани третмани који не испољавају цитотоксично дејство за испитивање функционалног одговора Caco-2 ћелија.Испитивањем експресије одабраних гена и заступљености одговарајућих протеинских маркера биће процењено да ли функционални одговор Caco-2 ћелија зависи од удела млека магарице и овчијег млека у испитиваним комбинацијама.

***Second phase***

*In the second phase, the functional response of differentiated human intestinal epithelial Caco-2 cells to digestates obtained from different volume ratios of Balkan donkey milk and sheep milk from the White Metohija strain of Pramenka, following in vitro digestion under simulated gastrointestinal conditions, will be examined. Samples will be prepared in donkey milk-to-sheep milk ratios of 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 and 0:100. All samples will be subjected to the same gastrointestinal digestion protocol, thereby enabling their direct comparison. The protein profiles and antimicrobial potential of the obtained digestates will be examined, and following cytotoxicity assessment, non-cytotoxic treatments will be selected for the evaluation of the functional response of Caco-2 cells. By examining the expression of selected genes and the abundance of corresponding protein markers, it will be assessed whether the functional response of Caco-2 cells depends on the proportion of donkey milk and sheep milk in the investigated combinations.*

**Трећа фаза**

У трећој фази биће испитан метаболомски профил дигестованих узорака млека балканске магарице, овчијег млека белог метохијског соја праменке и њихових комбинација. Метаболомско профилисање биће спроведено применом течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом високе резолуције. Добијени подаци омогућиће поређење метаболомских профила дигестата појединачних врста млека и њихових различитих комбинација, као и идентификацију метаболита или група метаболита који доприносе разликама између испитиваних узорака.Резултати метаболомског профилисања биће повезани са резултатима функционалних и молекуларно-биолошких анализа ради процене могуће повезаности између метаболомског састава дигестата и функционалног одговора диференцираних Caco-2 ћелија.

***Third phase***

*In the third phase, the metabolomic profiles of digested samples of Balkan donkey milk, sheep milk from the White Metohija strain of Pramenka and their combinations will be examined. Metabolomic profiling will be performed using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. The obtained data will enable comparison of the metabolomic profiles of digestates from the individual milks and their different combinations, as well as the identification of metabolites or groups of metabolites contributing to the differences among the examined samples.The metabolomic profiling results will be integrated with the results of the functional and molecular biological analyses in order to assess the possible association between the metabolomic composition of the digestates and the functional response of differentiated Caco-2 cells*.

**7. Материјал, методе истраживања и опрема која ће се користити за експериментални рад**

**7. Materials, research methods and equipment to be used in the experimental work**

**Материјал**

**Млеко магарица расе Балкански магарац и оваца Белог метохијског соја праменке**

Узорци млека биће прикупљени од клинички здравих музних животиња, без видљивих знакова болести и одступања у исхрани или понашању. Истраживањем ће бити обухваћене магарице расе Балкански магарац (n = 35) и овце Белог метохијског соја праменке (n = 30), различите старости и у различитим фазама лактације. Узорци ће бити узимани асептично у стерилне посуде са тамним дном, непосредно пре главне ручне муже, након прегледа и одбацивања првих млазева млека. Пре муже, млечна жлезда биће опрана топлом водом, без употребе дезинфицијенса, и осушена чистим убрусом за једнократну употребу. Приликом узорковања млека магарица, пуле ће се налазити у видном пољу мајке ради подстицања рефлекса отпуштања млека. Ручну мужу обављаће власник фарме уз употребу рукавица за једнократну употребу, које ће бити мењане између животиња. Узорци ће одмах бити означени и транспортовани до лабораторије у преносивом фрижидеру на температури од 4 °C, где ће бити подвргнути микробиолошким, хемијским и даљим експерименталним испитивањима. Узорковање ће бити обављено на фармама породица Иванов и Васов, на подручју Парка природе „Стара планина".

***Materials***

***Milk from Balkan donkeys and White Metohija Pramenka sheep***

*Milk samples will be collected from clinically healthy lactating animals without visible signs of disease or abnormalities in feeding or behaviour. The study will include Balkan donkeys (n = 35) and sheep of the White Metohija strain of Pramenka (n = 30), differing in age and stage of lactation. Samples will be collected aseptically into sterile dark-bottom containers immediately before the main hand milking, following the examination and discarding of the foremilk. Before milking, the udder will be washed with warm water without disinfectants and dried using a clean disposable paper towel. During the sampling of donkey milk, the foal will remain within the dam's field of vision to stimulate the milk let-down reflex. Manual milking will be performed by the farm owner using disposable gloves, which will be changed between animals. Samples will be labelled immediately and transported to the laboratory at 4 °C in a portable refrigerator, where they will undergo microbiological, chemical and further experimental analyses. Sampling will be carried out at the farms of the Ivanov and Vasov families in the Stara Planina Nature Park area.*

**Методе рада**

Након почетне карактеризације млека биће припремљени узорци млека магарице, овчијег млека и њихових комбинација, који ће бити подвргнути стандардизованој *in vitro* гастроинтестиналној дигестији. У добијеним дигестатима биће испитани протеински профил и антимикробни потенцијал. Функционални ефекти дигестата биће испитани на моделу диференцираних хуманих интестиналних епителних Caco-2 ћелија. Након процене цитотоксичности, третмани који не испоље цитотоксично дејство биће коришћени за анализу експресије одабраних гена методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (qPCR) и за испитивање заступљености одговарајућих протеинских маркера методом Western blot. Метаболомски профили дигестата биће испитани нециљаним приступом применом течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом високе резолуције (LC–HRMS).

***Methods***

*Following the initial characterisation of the milk, donkey milk, sheep milk and their combinations will be prepared and subjected to a standardised in vitro gastrointestinal digestion procedure. The protein profiles and antimicrobial potential of the resulting digestates will be examined. Their functional effects will be investigated using differentiated human intestinal epithelial Caco-2 cells. Following cytotoxicity assessment, treatments that do not exhibit cytotoxic effects will be used to analyse the expression of selected genes by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and the abundance of corresponding protein markers by Western blot. The metabolomic profiles of the digestates will be investigated using an untargeted approach based on liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC–HRMS).*

**Почетна карактеризација узорака млека**

Основни хемијски састав млека и број соматских ћелија биће одређени применом система FOSS CombiFoss™ FT+, који обједињује модуле MilkoScan™ FT+ и Fossomatic™ FC. Хемијски састав биће одређен методом инфрацрвене спектрометрије у средњем инфрацрвеном подручју, у складу са стандардом ISO 9622:2020, а број соматских ћелија методом проточне цитометрије, у складу са стандардом ISO 13366-2:2008. Укупан број аеробних мезофилних бактерија биће одређен у складу са стандардом SRPS EN ISO 4833-1:2014.

***Initial characterisation of milk samples***

*The basic chemical composition of the milk and the somatic cell count will be determined using the FOSS CombiFoss™ FT+ system, which combines the MilkoScan™ FT+ and Fossomatic™ FC modules. Milk composition will be determined by mid-infrared spectrometry in accordance with ISO 9622:2020, while the somatic cell count will be determined by flow cytometry in accordance with ISO 13366-2:2008. The total aerobic mesophilic bacterial count will be determined in accordance with SRPS EN ISO 4833-1:2014.*

**Припрема узорака и комбинација млека**

Након почетне карактеризације биће припремљени узорци млека магарице и овчијег млека, као и њихове комбинације у следећим запреминским односима млека магарице и овчијег млека: 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 и 0:100. Сви узорци биће подвргнути истом поступку in vitro гастроинтестиналне дигестије, чиме ће бити обезбеђена њихова непосредна упоредивост током функционалних, молекуларно-биолошких и метаболомских испитивања.

***Preparation of milk samples and combinations***

*Following the initial characterisation, donkey milk, sheep milk and their combinations will be prepared at the following donkey milk-to-sheep milk volume ratios: 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 and 0:100. All samples will be subjected to the same in vitro gastrointestinal digestion procedure, thereby ensuring their direct comparability in subsequent functional, molecular biological and metabolomic analyses.*

**Дигестија у симулираним условима гастроинтестиналног тракта**

Узорци млека магарице, овчијег млека и њихових комбинација биће подвргнути статичком *in vitro* моделу гастроинтестиналне дигестије према стандардизованом INFOGEST протоколу, уз одговарајуће модификације (Brodkorb и сар., 2019). Поступак ће обухватити оралну, желудачну и интестиналну фазу.У оралној фази, 22,5 mL узорка биће помешано са 15,75 mL симулиране пљувачне течности (Simulated Salivary Fluid – SSF). Раствор α-амилазе, припремљен у 2,25 mL SSF-а, биће додат тако да коначна активност ензима у смеши износи 75 U/mL. Калцијум-хлорид биће додат до коначне концентрације од 0,75 mM, а додавањем 4,5 mL воде биће постигнута укупна запремина од 45 mL. Смеша ће бити инкубирана 2 минута на 37 °C уз мешање при 180 rpm.У желудачној фази, 45 mL смеше из оралне фазе биће помешано са 41 mL симулиране желудачне течности (Simulated Gastric Fluid – SGF). Пепсин ће бити додат до активности од 2.000 U/mL, а калцијум-хлорид до концентрације од 0,075 mM. Додавањем воде биће постигнута коначна запремина од 90 mL, док ће pH вредност бити подешена на 3,0 применом 3 M HCl. Смеша ће бити инкубирана 120 минута на 37 °C уз стално мешање при 180 rpm.У интестиналној фази, смеша добијена након желудачне дигестије биће помешана са 72 mL симулиране интестиналне течности (Simulated Intestinal Fluid – SIF). Биће додате говеђе жучне соли до концентрације од 4,7 mg/mL и панкреатин до протеазне активности од 800 U/mL. Додавањем воде биће постигнута коначна запремина од 180 mL, а pH вредност подешена на 7,0 применом 3 M NaOH. Смеша ће бити инкубирана 120 минута на 37 °C уз стално мешање при 180 rpm. По завршетку дигестије, узорци ће бити замрзнути и чувани на −20 °C до даљих

анализа. Контрола која представља допринос дигестивних течности, раствора и ензима биће припремљена мешањем свих компоненти у истим односима као током симулиране дигестије и инкубирана упоредо са узорцима.

***Digestion under simulated gastrointestinal conditions***

*Donkey milk, sheep milk and their combinations will be subjected to a static in vitro gastrointestinal digestion model according to the standardised INFOGEST protocol, with appropriate modifications (Brodkorb et al., 2019). The procedure will comprise oral, gastric and intestinal phases.In the oral phase, 22.5 mL of the sample will be mixed with 15.75 mL of Simulated Salivary Fluid (SSF). An α-amylase solution prepared in 2.25 mL of SSF will be added to obtain a final enzyme activity of 75 U/mL. Calcium chloride will be added to a final concentration of 0.75 mM, and 4.5 mL of water will be added to obtain a total volume of 45 mL. The mixture will be incubated for 2 min at 37 °C with shaking at 180 rpm.In the gastric phase, 45 mL of the oral-phase mixture will be combined with 41 mL of Simulated Gastric Fluid (SGF). Pepsin will be added to obtain an activity of 2,000 U/mL, and calcium chloride will be added to a concentration of 0.075 mM. Water will be added to obtain a final volume of 90 mL, and the pH will be adjusted to 3.0 using 3 M HCl. The mixture will be incubated for 120 min at 37 °C with constant shaking at 180 rpm.In the intestinal phase, the mixture obtained after gastric digestion will be combined with 72 mL of Simulated Intestinal Fluid (SIF). Bovine bile salts will be added to a concentration of 4.7 mg/mL, and pancreatin will be added to obtain a protease activity of 800 U/mL. Water will be added to reach a final volume of 180 mL, and the pH will be adjusted to 7.0 using 3 M NaOH. The mixture will be incubated for 120 min at 37 °C with constant shaking at 180 rpm. After digestion, the samples will be frozen and stored at −20 °C until further analysis. A control representing the contribution of the digestive fluids, solutions and enzymes will be prepared by combining all components in the same proportions used during simulated digestion and incubated alongside the samples*.

**Испитивање протеинских профила *in vitro* дигестата методом SDS-PAGE**

Протеински профили *in vitro* дигестата млека магарице, овчијег млека и њихових комбинација биће испитани методом SDS-полиакриламидне гел-електрофорезе (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis – SDS-PAGE). Једнака количина протеина сваког узорка биће ресуспендована у 2× Laemmli пуферу, који садржи 4% SDS, 20% глицерола, 10% 2-меркаптоетанола, 0,004% бромфенол-плавог и 125 mM Tris-HCl, pH 6,8. Узорци ће бити инкубирани 5 минута на 95 °C. Протеини ће бити раздвојени према молекулској маси у дисконтинуираном систему гелова. Концентрациони гел садржаће 7% акриламид/бисакриламид, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,07% амонијум-персулфата и 0,1% TEMED-а, док ће раздвајајући гел садржати 12% акриламид/бисакриламид, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,07% амонијум-персулфата и 0,1% TEMED-а. Електрофоретски пуфер садржаће 25 mM Tris-а, pH 8,3, 186 mM глицина и 0,1% SDS-а. Електрофореза ће бити спроведена при константној јачини струје од 20 mA. Након раздвајања, протеини ће бити бојени комерцијалном бојом за гелове током 2 сата, а гелови ће бити обезбојени преко ноћи у раствору метанола, сирћетне киселине и дестиловане воде у запреминском односу 20:10:70.

***Analysis of the protein profiles of in vitro digestates by SDS-PAGE***

*The protein profiles of in vitro digestates of donkey milk, sheep milk and their combinations will be analysed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). An equal amount of protein from each sample will be resuspended in 2× Laemmli buffer containing 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue and 125 mM Tris-HCl, pH 6.8. The samples will be incubated for 5 min at 95 °C.Proteins will be separated according to molecular weight using a discontinuous gel system. The stacking gel will contain 7% acrylamide/bisacrylamide, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.07% ammonium persulphate and 0.1% TEMED, while the separating gel will contain 12% acrylamide/bisacrylamide, 375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS, 0.07% ammonium persulphate and 0.1% TEMED. The electrophoresis buffer will contain 25 mM Tris, pH 8.3, 186 mM glycine and 0.1% SDS. Electrophoresis will be performed at a constant current of 20 mA. Following separation, proteins will be stained with a commercial gel stain for 2 h, and the gels will be destained overnight in a methanol, acetic acid and distilled water solution at a volume ratio of 20:10:70*.

**Испитивање антимикробног потенцијала *in vitro* дигестата методом дифузионог теста са бунарићима**

Антимикробни потенцијал *in vitro* дигестата млека магарице, овчијег млека и њихових комбинација биће испитан методом дифузионог теста са бунарићима (Lozo и сар.,

2004). У Петријеве шоље биће разливен танак слој одговарајуће чврсте хранљиве подлоге, који ће бити остављен да се осуши и очврсне у стерилним условима. Након тога биће направљени бунарићи пречника 7 mm, а подлога ће бити преливена танким слојем одговарајућег медијума са ниским садржајем агара, инокулисаног са $10^6$–$10^7$ ћелија одабраног индикаторског соја по милилитру. У сваки бунарић биће нането по 50 μL одговарајућег дигестата. На ивицу бунарића биће постављен кристал Pronase E (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД) ради процене протеинске природе антимикробне компоненте. Плоче ће бити инкубиране 24 сата на температури оптималној за раст индикаторског соја. Антимикробна активност биће утврђена на основу појаве зоне инхибиције око бунарића, док ће утицај Pronase E на формирану зону указати на могућу протеинску природу антимикробног једињења.

***Assessment of the antimicrobial potential of in vitro digestates by the agar well-diffusion assay***

*The antimicrobial potential of in vitro digestates of donkey milk, sheep milk and their combinations will be evaluated by the agar well-diffusion assay (Lozo et al., 2004). A thin layer of an appropriate solid growth medium will be poured into Petri dishes and allowed to dry and solidify under sterile conditions. Wells 7 mm in diameter will then be prepared, and the plates will be overlaid with a thin layer of the appropriate low-agar medium inoculated with $10^6$–$10^7$ cells of the selected indicator strain per millilitre.Fifty microlitres of the corresponding digestate will be added to each well. A crystal of Pronase E (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) will be placed at the edge of the well to assess whether the antimicrobial component is proteinaceous. The plates will be incubated for 24 h at the temperature optimal for the growth of the indicator strain. Antimicrobial activity will be determined by the appearance of an inhibition zone around the well, while the effect of Pronase E on the zone will indicate the possible proteinaceous nature of the antimicrobial compound.*

**Култивација и диференцијација Caco-2 ћелијске линије и третман дигестатима**

Као *in vitro* модел епителне баријере танког црева биће коришћена хумана епителна ћелијска линија колоректалног аденокарцинома Caco-2 (ATCC HTB-37). Ћелије ће бити гајене у медијуму Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), обогаћеном са 10% феталног говеђег серума, 100 μg/mL стрептомицина, 100 U/mL пеницилина и 2 mM L-глутамина. Културе ће бити одржаване у фласковима површине 75 $cm^2$ на 37 °C, у влажној атмосфери са 5% $CO_2$. За одвајање ћелија од подлоге биће коришћен раствор трипсина и EDTA.За диференцијацију, Caco-2 ћелије биће посејане у плоче са 24 бунарића у густини од $2 \times 10^5$ ћелија по бунарићу и инкубиране 21 дан на 37 °C, при чему ће достићи приближно $2 \times 10^6$ ћелија по бунарићу. Током диференцијације медијум ће бити мењан свака три дана. Након диференцијације, ћелије ће бити третиране дигестатима у концентрацији од 100 μg/mL током 4 сата. По завршетку третмана, ћелије ће бити три пута испране PBS-ом ради уклањања преосталог дигестата, а затим одвојене од подлоге применом раствора трипсина и EDTA.

***Cultivation and differentiation of the Caco-2 cell line and treatment with digestates***

*The human colorectal adenocarcinoma epithelial cell line Caco-2 (ATCC HTB-37) will be used as an in vitro model of the small intestinal epithelial barrier. Cells will be cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 μg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin and 2 mM L-glutamine. Cultures will be maintained in 75 $cm^2$ flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% $CO_2$. A trypsin–EDTA solution will be used to detach the cells.For differentiation, Caco-2 cells will be seeded in 24-well plates at a density of $2 \times 10^5$ cells per well and incubated for 21 days at 37 °C, reaching approximately $2 \times 10^6$ cells per well. During differentiation, the culture medium will be changed every three days. Following differentiation, the cells will be treated with digestates at a concentration of 100 μg/mL for 4 h. After treatment, the cells will be washed three times with PBS to remove residual digestate and then detached using a trypsin–EDTA solution.*

**Испитивање цитотоксичности**

Цитотоксичност *in vitro* дигестата биће процењена одређивањем активности лактат-дехидрогеназе (LDH) ослобођене у медијум, применом комерцијалног LDH Cytotoxicity Assay Kit-a (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, САД). После четворочасовног третмана Caco-2 ћелија, супернатанти ће бити прикупљени, а активност ослобођене LDH одређена према упутству произвођача. Апсорбанца ће бити мерена на 450 nm помоћу читача микроплоча Infinite 200 Pro (MTX Lab Systems). За даља молекуларно-биолошка испитивања биће коришћени третмани који не испоље цитотоксично дејство.

***Cytotoxicity assay***

*The cytotoxicity of the in vitro digestates will be assessed by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) released into the culture medium using a commercial LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Following the 4 h treatment of Caco-2 cells, the supernatants will be collected and released LDH activity will be determined according to the manufacturer's instructions. Absorbance will be measured at 450 nm using an Infinite 200 Pro microplate reader (MTX Lab Systems). Treatments that do not exhibit cytotoxic effects will be used in subsequent molecular-biological analyses.*

**Изоловање укупне РНК из Caco-2 ћелија**

Након завршеног третмана и прикупљања Caco-2 ћелија, укупна РНК биће изолована применом реагенса TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific), према протоколу који су описали Lukić и сар. (2013) и у складу са упутством произвођача. Ћелијски материјал биће лизиран и хомогенизован у реагенсу TRIzol™, чиме ће бити омогућено ослобађање укупне РНК и истовремена инактивација рибонуклеаза.Након додавања хлороформа и центрифугирања, биће извршено раздвајање смеше на органску и водену фазу. Водена фаза, која садржи РНК, биће пажљиво издвојена и пренета у нове микротубе. РНК ће затим бити преципитована изопропанолом, испрана 75% етанолом и, након сушења талога, растворена у води без рибонуклеаза.Ради уклањања могуће контаминације геномском ДНК, изолована РНК биће третирана ензимом DNase I применом комплета RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific), према упутству произвођача. Овим поступком биће спречено да евентуално присутна геномска ДНК утиче на резултате касније квантитативне PCR анализе.Концентрација и чистоћа изоловане РНК биће одређене спектрофотометријски. До извођења реакције реверзне транскрипције, узорци изоловане РНК биће чувани на температури од −80 °C.

***Isolation of total RNA from Caco-2 cells***

*Following treatment and collection of Caco-2 cells, total RNA will be isolated using TRIzol™ reagent (Thermo Fisher Scientific), according to the protocol described by Lukić et al. (2013) and the manufacturer's instructions. The cellular material will be lysed and homogenised in TRIzol™ reagent, allowing the release of total RNA and the simultaneous inactivation of ribonucleases. Following the addition of chloroform and centrifugation, the mixture will be separated into organic and aqueous phases. The RNA-containing aqueous phase will be carefully collected and transferred into new microtubes. RNA will subsequently be precipitated with isopropanol, washed with 75% ethanol and, after drying of the pellet, dissolved in RNase-free water. To remove potential genomic DNA contamination, the isolated RNA will be treated with DNase I using the RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. This treatment will prevent residual genomic DNA from affecting the subsequent quantitative PCR analysis. The concentration and purity of the isolated RNA will be determined spectrophotometrically. Until reverse transcription is performed, the isolated RNA samples will be stored at −80 °C.*

**Реакција реверзне транскрипције**

Реверзна транскрипција, односно синтеза комплементарне ДНК (cDNA), биће изведена применом ензима RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), према упутству произвођача. Као полазна матрица за сваки узорак биће коришћен 1 μg укупне РНК изоловане из Caco-2 ћелија. За започињање синтезе комплементарне ДНК биће употребљени насумични хексамери, док ће RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) бити додат ради спречавања разградње РНК током реакције.Одговарајућа запремина узорка која садржи 1 μg укупне РНК биће допуњена водом без рибонуклеаза до запремине од 10 μL. Након додавања 100 pmol насумичних хексамера, растворених у 3 μL, реакциона смеша запремине 13 μL биће инкубирана 5 минута на 65 °C ради денатурације секундарних структура РНК, а затим охлађена на 4 °C.У реакциону смешу потом ће бити додато 4 μL реакционог пуфера, 2 μL смеше дезоксирибонуклеотида, 0,5 μL RiboLock RNase Inhibitor-a и 0,5 μL ензима RevertAid Reverse Transcriptase, до коначне запремине реакције од 20 μL. Реакција реверзне транскрипције биће изведена

инкубацијом током 10 минута на 25 °C, затим 60 минута на 42 °C, након чега ће ензим бити инактивиран инкубацијом током 10 минута на 70 °C.За сваки узорак биће постављена и негативна контрола реверзне транскрипције, која ће садржати све компоненте реакционе смеше осим ензима реверзне транскриптазе. Ова контрола биће коришћена за проверу могућег присуства заостале геномске ДНК у узорцима након третмана ензимом DNase I.Присуство синтетисане комплементарне ДНК и одсуство контаминације геномском ДНК биће проверени ланчаном реакцијом полимеразе применом прајмера за референтни ген GAPDH. У реакцију ће бити укључени синтетисана cDNA и одговарајућа негативна контрола без реверзне транскриптазе. Реакциони програм обухватиће почетну денатурацију током 5 минута на 95 °C, након чега ће уследити 30 циклуса денатурације током 30 секунди на 95 °C, хибридизације прајмера током 30 секунди на 55 °C и елонгације током 30 секунди на 72 °C. Завршна елонгација биће изведена током 7 минута на 72 °C.Добијени PCR производи биће проверени електрофорезом на 1% агарозном гелу припремљеном у TAE пуферу. Електрофореза ће бити изведена при константном напону од 80 V, а величина умножених фрагмената биће процењена поређењем са одговарајућим ДНК стандардом. Реакција реверзне транскрипције и контролна PCR анализа биће спроведене на апарату GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, САД). Синтетисана комплементарна ДНК биће чувана на −20 °C до квантитативне PCR анализе.

***Reverse transcription reaction***

*Reverse transcription, i.e. complementary DNA (cDNA) synthesis, will be performed using RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA isolated from Caco-2 cells will be used as the starting template for each sample. Random hexamers will be used to initiate cDNA synthesis, while RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) will be added to prevent RNA degradation during the reaction. An appropriate volume of each sample containing 1 μg of total RNA will be adjusted to 10 μL with RNase-free water. Following the addition of 100 pmol of random hexamers dissolved in 3 μL, the resulting 13 μL mixture will be incubated at 65 °C for 5 min to denature RNA secondary structures and subsequently cooled to 4 °C.Four microlitres of reaction buffer, 2 μL of deoxyribonucleotide mixture, 0.5 μL of RiboLock RNase Inhibitor and 0.5 μL of RevertAid Reverse Transcriptase will then be added to obtain a final reaction volume of 20 μL. Reverse transcription will be performed by incubation at 25 °C for 10 min and at 42 °C for 60 min, followed by enzyme inactivation at 70 °C for 10 min.A negative reverse-transcription control containing all reaction components except reverse transcriptase will be prepared for each sample. This control will be used to verify the absence of residual genomic DNA following DNase I treatment. The presence of synthesised cDNA and the absence of genomic DNA contamination will be verified by polymerase chain reaction using primers specific for the GAPDH reference gene. Both the synthesised cDNA and the corresponding negative reverse-transcription control will be included in the analysis. The reaction programme will comprise initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, primer annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. Final extension will be performed at 72 °C for 7 min. The obtained PCR products will be examined by electrophoresis on a 1% agarose gel prepared in TAE buffer. Electrophoresis will be conducted at a constant voltage of 80 V, and the sizes of the amplified fragments will be estimated by comparison with an appropriate DNA ladder. Reverse transcription and confirmatory PCR analysis will be performed using a GeneAmp PCR System 2700 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The synthesised cDNA will be stored at −20 °C until quantitative PCR analysis.*

**Квантитативна реакција ланчаног умножавања у реалном времену (qPCR)**

Синтетисана комплементарна ДНК биће коришћена као матрица за одређивање релативне експресије одабраних гена методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (qPCR). Реакционе смеше биће припремљене применом комплета IC Green qPCR Universal Kit (NIPPON Genetics, Düren, Немачка), у складу са упутством произвођача, уз употребу комплементарне ДНК и специфичних

парова прајмера за циљне и референтни ген.Умножавање комплементарне ДНК и праћење флуоресцентног сигнала у реалном времену биће изведени на апарату Line-Gene 9600 Plus Real-Time PCR (Hangzhou Bioer Technology). Амплификациони програм обухватиће почетну активацију током 2 минута на 95 °C, након чега ће уследити 40 циклуса денатурације током 5 секунди на 95 °C и хибридизације прајмера и елонгације током 30 секунди на 60 °C. На основу промене интензитета флуоресцентног сигнала током реакције биће одређене Ct вредности за сваки испитивани ген.Биће анализирана експресија гена повезаних са процесима аутофагије: ULK1, AMBRA1, BECN1, ATG5, MAP1LC3B, GABARAP и SQSTM1. У оквиру испитивања интегритета интестиналне епителне баријере биће праћена експресија гена CLDN4, OCLN и CDH1. Експресија гена DEFB1 биће анализирана као показатељ урођене антимикробне одбране, док ће експресија гена MUC2 и MUC5 бити испитана ради процене утицаја третмана на мукозну заштиту. Експресија сваког циљног гена биће нормализована у односу на експресију референтног гена GAPDH. Вредност ΔCt биће израчуната као разлика између Ct вредности циљног гена и Ct вредности гена GAPDH у истом узорку. Вредност ΔΔCt представљаће разлику између ΔCt вредности третираног узорка и ΔCt вредности узорка који је одређен као калибратор. Као калибратор биће коришћене нетретиране Caco-2 ћелије. Релативна промена експресије циљних гена биће израчуната методом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ и приказана у односу на експресију утврђену у нетретираним ћелијама.

***Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)***

*The synthesised complementary DNA will be used as a template for determining the relative expression of selected genes by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Reaction mixtures will be prepared using the IC Green qPCR Universal Kit (NIPPON Genetics, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions, with complementary DNA and gene-specific primer pairs for the target and reference genes. Complementary DNA amplification and real-time fluorescence monitoring will be performed using a Line-Gene 9600 Plus Real-Time PCR instrument (Hangzhou Bioer Technology). The amplification programme will comprise initial activation at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 5 s and primer annealing and extension at 60 °C for 30 s. Ct values for each investigated gene will be determined from changes in fluorescence intensity recorded during the reaction. The expression of genes associated with autophagy, namely ULK1, AMBRA1, BECN1, ATG5, MAP1LC3B, GABARAP and SQSTM1, will be analysed. The expression of CLDN4, OCLN and CDH1 will be examined to assess intestinal epithelial barrier integrity. DEFB1 expression will be analysed as an indicator of innate antimicrobial defence, while MUC2 and MUC5 expression will be examined to evaluate the effects of the treatments on mucosal protection. The expression of each target gene will be normalised to the expression of the GAPDH reference gene. The ΔCt value will be calculated as the difference between the Ct value of the target gene and that of GAPDH in the same sample. The ΔΔCt value will represent the difference between the ΔCt value of the treated sample and the ΔCt value of the sample defined as the calibrator. Untreated Caco-2 cells will be used as the calibrator. Relative changes in target-gene expression will be calculated using the 2^(−ΔΔCt) method and expressed relative to the levels determined in untreated cells.*

**Метода Western blot**

Након третмана, Caco-2 ћелије биће чуване у микротубама на −80 °C до изоловања протеина. Укупни протеини биће екстраховани применом 200 µL RIPA пуфера, који садржи 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40 и 0,25% натријум-деоксихолата. Непосредно пре употребе пуферу ће бити додати протеазни инхибитор (Roche, Basel, Швајцарска) и 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich) ради спречавања разградње протеина. Ћелијске суспензије у RIPA пуферу биће инкубиране 1 сат на леду, а затим центрифугиране 15 минута при 12.000 rpm и 4 °C. Супернатанти ће бити прикупљени за даљу анализу. Концентрација протеина биће одређена спектрофотометријски применом Bradford реагенса (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, САД). За израду стандардне криве биће коришћен албумин говеђег серума (BSA) у опсегу концентрација од 1 до 20 mg/mL, а апсорбанца ће бити мерена на 595 nm помоћу спектрофотометра Ultrospec 3300 Pro (Amersham Biosciences, Уједињено Краљевство).Једнака количина протеина из сваког узорка (20 µg) биће ресуспендована у 2× Laemmli пуферу и инкубирана 5 минута на 95 °C. Протеини ће бити раздвојени методом SDS-PAGE у

дисконтинуираном систему који се састоји од 7% концентрационог и 12% раздвајајућег гела, при константној јачини струје од 20 mA. Раздвојени протеини биће пренети на нитроцелулозну мембрану величине пора 0,2 μm (GE Healthcare) применом система за влажни трансфер Bio-Rad Mini Trans-Blot, према упутству произвођача. Након трансфера, мембране ће бити блокиране преко ноћи на 4 °C у 5% раствору обраног млека у TBST пуферу, који садржи 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl и 0,05% Tween-20. Положај протеина на мембрани биће одређен применом стандарда Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific). Мембране ће потом бити инкубиране 2 сата на собној температури са примарним антителима за протеине од интереса, испране три пута по 15 минута TBST пуфером и инкубиране 1 сат са одговарајућим секундарним антителима обележеним пероксидазом рена (horseradish peroxidase – HRP). После три додатна испирања, сигнал ће бити развијен применом ECL супстрата (Immobilon Western, Merck Millipore) и забележен на рендгенском филму. Дензитометријска анализа биће спроведена у програму ImageJ, а заступљеност протеина од интереса биће изражена релативно у односу на GAPDH као ендогену контролу.

**Western blot analysis**

*Following treatment, Caco-2 cells will be stored in microtubes at −80 °C until protein isolation. Total proteins will be extracted using 200 μL of RIPA buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40 and 0.25% sodium deoxycholate. A protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland) and 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich) will be added immediately before use to prevent protein degradation. Cell suspensions in RIPA buffer will be incubated on ice for 1 h and then centrifuged for 15 min at 12,000 rpm and 4 °C. The supernatants will be collected for further analysis. Protein concentration will be determined spectrophotometrically using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Bovine serum albumin (BSA) at concentrations ranging from 1 to 20 mg/mL will be used to construct the standard curve, and absorbance will be measured at 595 nm using an Ultrospec 3300 Pro spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK).An equal amount of protein from each sample (20 μg) will be resuspended in 2× Laemmli buffer and incubated for 5 min at 95 °C. Proteins will be separated by SDS-PAGE using a discontinuous system consisting of a 7% stacking gel and a 12% separating gel at a constant current of 20 mA. The separated proteins will be transferred onto a 0.2 μm-pore-size nitrocellulose membrane (GE Healthcare) using a Bio-Rad Mini Trans-Blot wet transfer system according to the manufacturer's instructions. Following transfer, membranes will be blocked overnight at 4 °C in 5% skimmed milk prepared in TBST buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20. Protein positions on the membrane will be determined using a Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific). Membranes will then be incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies against the proteins of interest, washed three times for 15 min with TBST and incubated for 1 h with the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. Following three additional washes, the signal will be developed using an ECL substrate (Immobilon Western, Merck Millipore) and recorded on X-ray film. Densitometric analysis will be performed using ImageJ, and the abundance of the proteins of interest will be expressed relative to GAPDH as the endogenous control.*

**Припрема узорака за метаболомско профилисање**

За метаболомско профилисање биће коришћени дигестати млека магарице, овчијег млека и њихових комбинација. Екстракција ће бити спроведена према поступку који су описали Nobile и сар. (2025). Из сваког дигестата биће узета аликвота од 2 mL и помешана са 4 mL ацетонитрила LC–MS чистоће, закиселеног са 3% мравље киселине. Узорци ће бити интензивно мешани 15 минута, а затим центрифугирани 10 минута при 5.000 × g и 4 °C ради таложења протеина и уклањања преципитата. Један милилитар добијеног супернатанта биће филтриран кроз целулозни филтер величине пора 0,45 μm и пренет у вијалу. У хроматографски систем биће инјектирано 5 μL добијеног екстракта.Под истим условима биће припремљене три процедуралне слепе пробе без млечне матрице, које ће бити коришћене за формирање листе позадинских јона за искључивање. Обједињени контролни узорак квалитета биће припремљен мешањем једнаких аликвота свих екстраката и коришћен за формирање листе јона за укључивање.

**Sample preparation for metabolomic profiling**

*Digestates of donkey milk, sheep milk and their combinations will be used for metabolomic profiling. Extraction will be performed according to the procedure described by Nobile et al.*

*(2025). A 2 mL aliquot of each digestate will be mixed with 4 mL of LC–MS-grade acetonitrile acidified with 3% formic acid. The samples will be vigorously mixed for 15 min and then centrifuged for 10 min at 5,000 × g and 4 °C to precipitate proteins and remove the resulting precipitate. One millilitre of the supernatant will be filtered through a 0.45 µm cellulose filter and transferred into a vial. Five microlitres of the extract will be injected into the chromatographic system. Three procedural blanks without the milk matrix will be prepared under the same conditions and used to generate a background-ion exclusion list. A pooled quality-control sample will be prepared by combining equal aliquots of all extracts and used to generate an ion inclusion list.*

**Течна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом високе резолуције**

Хроматографско раздвајање биће изведено на Vanquish HPLC систему применом Accucore C18 колоне димензија 150 × 2,1 mm и величине честица 2,6 µm (Thermo Fisher Scientific). Као мобилна фаза A биће коришћена вода закисељена са 0,1% мрављe киселине, а као мобилна фаза B метанол. За детекцију ће бити коришћен масени спектрометар високе резолуције Orbitrap Exploris 120. Метаболомско испитивање биће спроведено у позитивном и негативном режиму електроспреј-јонизације, у засебним аналитичким серијама.Применом програма AcquireX и радног тока Deep Scan биће формирана листа позадинских јона за искључивање на основу процедуралних слепих проба, као и листа јона за укључивање на основу обједињеног контролног узорка квалитета. Наведене листе биће динамички прилагођаване између поновљених инјектирања узорака. Метаболомско профилисање биће спроведено нециљаним приступом. Сирови подаци добијени на систему Orbitrap Exploris 120 биће обрађени у програму Compound Discoverer 3.4 ради хемијске идентификације и статистичке евалуације детектованих једињења. Анализа ће обухватити профилисање деривата аминокиселина, малих пептида, липидних деривата и других нискомолекуларних једињења, као и процену могуће повезаности утврђених метаболомских разлика са функционалним одговором диференцираних Caco-2 ћелија.

**Liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry**

*Chromatographic separation will be performed using a Vanquish HPLC system equipped with an Accucore C18 column measuring 150 × 2.1 mm with a particle size of 2.6 µm (Thermo Fisher Scientific). Water acidified with 0.1% formic acid will be used as mobile phase A, and methanol as mobile phase B. Detection will be carried out using an Orbitrap Exploris 120 high-resolution mass spectrometer. Metabolomic analysis will be performed in positive and negative electrospray ionisation modes in separate analytical runs. AcquireX software with the Deep Scan workflow will be used to generate a background-ion exclusion list from the procedural blanks and an ion inclusion list from the pooled quality-control sample. These lists will be dynamically updated between replicate sample injections. Metabolomic profiling will be performed using an untargeted approach. Raw data acquired using the Orbitrap Exploris 120 system will be processed in Compound Discoverer 3.4 for the chemical identification and statistical evaluation of the detected compounds. The analysis will include the profiling of amino acid derivatives, small peptides, lipid derivatives and other low-molecular-weight compounds, as well as the assessment of potential associations between the identified metabolomic differences and the functional response of differentiated Caco-2 cells*

**8. Место где ће се спроводити истраживање**:

*8. Place where research will be conducted:*

Теренски део истраживања, који обухвата узорковање млека балканске магарице и белог метохијског соја праменке, биће спроведен на фарми породице Иванов „Магарија”, у селу Козарица, и фарми породице Васов „Равна Шума”, у селу Пртопопинци. Обе фарме налазе се на подручју општине Димитровград, у оквиру заштићеног подручја Парка природе „Стара планина”. Наведено подручје представља значајан простор за очување аутохтоних генетичких ресурса, традиционалних система сточарства и агробиодиверзитета. Експериментални део истраживања биће спроведен у лабораторији Катедре за хигијену и технологију намирница анималног порекла Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду и у лабораторији Групе за интеракције пробиотика и микробиоте са домаћином Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Део истраживања биће спроведен и у Лабораторији за испитивање намирница животињског порекла Департмана ветеринарске медицине (DIVAS) Универзитета у Милану, у Лодију.

*The field part of the research, comprising the collection of milk samples from Balkan donkeys and White Metohija Pramenka sheep, will be conducted at the Ivanov family farm "Magarija" in the village of Kozarica and the Vasov family farm "Ravna Šuma" in the village of Prtopopinci. Both farms are located in the municipality of Dimitrovgrad, within the protected area of Stara Planina Nature Park. This area is of particular importance for the conservation of indigenous animal genetic resources, traditional livestock farming systems and agrobiodiversity.The experimental part of the research will be conducted in the laboratory of the Department of Hygiene and Technology of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, and in the laboratory of the Group for Probiotics and Microbiota–Host Interactions, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade. Part of the research will also be conducted in the Laboratory for the Inspection of Foods of Animal Origin, Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences (DIVAS), University of Milan, Lodi.*

**9. Ostali relevantni podaci: metode statističke obrade, veza na šire istraživačke projekte ako su istraživanja u okviru doktorske disertacije njihov deo i sl**:

*9. Other relevant information: the basic methods of statistical data processing, time and place of experimental verification of research results if such checks are planned, a link to a broader research project if the research is within their part of the doctoral thesis, etc.)*

**Статистичке методе:**

*Statistical analysis:*

Резултати функционалних и молекуларно-биолошких испитивања биће приказани као аритметичка средина ± стандардна девијација. Експерименти ће бити изведени у најмање три независна понављања, при чему ће сваки експериментални услов бити испитан у три техничка понављања. Пре примене статистичких тестова биће проверене претпоставке за примену параметријске анализе.Уколико буду испуњене претпоставке за примену параметријских тестова, разлике између експерименталних група биће испитане једнофакторском анализом варијансе (one-way ANOVA), након чега ће бити примењен Тукијев (Tukey) post hoc тест вишеструких поређења. Уколико претпоставке за примену параметријске анализе не буду испуњене, биће коришћен Крускал–Волисов тест (Kruskal–Wallis test), уз накнадна поређења применом Дановог (Dunn) теста вишеструких поређења. Повезаност између испитиваних променљивих биће процењена Пирсоновим коефицијентом корелације за параметријске, односно Спирмановим коефицијентом корелације за непараметријске податке. Вредност $p < 0,05$ сматраће се статистички значајном.За обраду података добијених метаболомским испитивањем биће примењене дескриптивне, униваријантне и мултиваријантне статистичке методе у оквиру модула Differential Analysis програма Compound Discoverer 3.4. Анализа ће обухватити анализу главних компоненти (principal component analysis, PCA), хијерархијску кластер анализу (hierarchical cluster analysis, HCA), volcano графиконе и box-and-whisker дијаграме. Поређење више група биће изведено једнофакторском анализом варијансе са Тукијевим post hoc тестом, док ће p-вредности бити кориговане Benjamini–Hochberg поступком ради контроле стопе лажно позитивних открића (false discovery rate, FDR).Резултати ће бити приказани табеларно и графички. Статистичка анализа функционалних и молекуларно-биолошких испитивања биће изведена у програму GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, САД), док ће метаболомски подаци бити обрађени у програму Compound Discoverer 3.4 (Thermo Fisher Scientific).

*The results of the functional and molecular biology assays will be presented as mean values ± standard deviation. The experiments will be performed in at least three independent replicates, with each experimental condition tested in technical triplicate. Before statistical testing, the assumptions required for parametric analysis will be evaluated. If the assumptions for parametric analysis are satisfied, differences among the experimental groups will be assessed using one-way analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey's post hoc multiple comparisons test. If the assumptions for parametric analysis are not satisfied, the Kruskal–Wallis test will be applied, followed by Dunn's multiple comparisons test.*

*Associations between the investigated variables will be assessed using Pearson's correlation coefficient for parametric data or Spearman's correlation coefficient for non-parametric data. A p value < 0.05 will be considered statistically significant. Descriptive, univariate and multivariate statistical methods will be applied to the metabolomics data using the Differential Analysis node within Compound Discoverer 3.4. The analysis will include principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), volcano plots and box-and-whisker plots. Multiple groups will be compared using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, and p values will be adjusted using the Benjamini–Hochberg procedure to control the false discovery rate (FDR). The results will be presented in tables and graphs. Statistical analysis of the functional and molecular biology assays will be performed using GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), while the metabolomics data will be processed using Compound Discoverer 3.4 (Thermo Fisher Scientific).*

**VI ЗАКЉУЧАК СА ОБРАЗЛОЖЕНОМ ОЦЕНОМ О ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ И КАНДИДАТА:**

*VI CONCLUSION WITH EXPLAINED ASSESSMENT OF DOCTORAL DISSERTATION TOPIC AND CANDIDATE COMPETENCIES FOR WORK ON DOCTORAL DISSERTATION:*

На основу приложене документације, Комисија сматра да Милан Богдановић испуњава све услове прописане Законом о високом образовању за израду докторске дисертације. На основу приложене пријаве и увида у актуелну литературу из области истраживања, Комисија закључује да је предложена тема докторске дисертације научно заснована и да се њеном реализацијом очекује стицање нових и оригиналних научних сазнања. Циљеви и задаци докторске дисертације прецизно су дефинисани, а методе предвиђене за њихову реализацију валидне су и правилно одабране.Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри Милану Богдановићу, доктору ветеринарске медицине, израду докторске дисертације под насловом: „**Функционални ефекти и метаболомски профил дигестованог млека аутохтоних раса магарица и оваца у *in vitro* моделу**".Комисија предлаже да се истраживања у оквиру докторске дисертације спроведу у лабораторији Катедре за хигијену и технологију намирница анималног порекла Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, у лабораторији Групе за интеракције пробиотика и микробиоте са домаћином Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, као и у Лабораторији за испитивање намирница животињског порекла Департмана ветеринарске медицине (DIVAS) Универзитета у Милану, у Лодију, Италија. За ментора 1 Комисија предлаже др Радославу Савић Радовановић, редовног професора Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, а за ментора 2 др Николу Поповића, вишег научног сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

*Based on the submitted documentation, the Commission considers that Milan Bogdanović meets all the requirements prescribed by the Law on Higher Education for the preparation of a doctoral dissertation. Based on the submitted application and a review of the current literature relevant to the field of research, the Commission concludes that the proposed doctoral dissertation topic is scientifically well founded and that its implementation is expected to generate new and original scientific knowledge. The aims and research tasks of the doctoral dissertation are precisely defined, and the methods proposed for their implementation are valid and appropriately selected.The Commission proposes that the Teaching and Scientific Council of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, accept this report and grant Milan Bogdanović, Doctor of Veterinary Medicine, approval to prepare a doctoral dissertation entitled: "**Functional effects and metabolomic profile of digested milk from autochthonous donkey and sheep breeds in an in vitro model**". The Commission proposes that the research within the doctoral dissertation be conducted in the laboratory of the Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade; in the laboratory of the Group for Probiotics and Microbiota–Host Interaction, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade; and in the Laboratory for the Inspection of Food of Animal Origin, Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences (DIVAS), University of Milan, Lodi, Italy.The*

*Commission proposes Radoslava Savić Radovanović, PhD, Full Professor at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, as mentor 1, and Nikola Popović, PhD, Associate Research Professor at the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, as mentor 2.*

**ДАТУМ** **ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ**

*DATE* *COMMISSION MEMBER SIGNATURES*

04.08.2026.

. Др Дејан Крњаић

*Dejan Krnjaić PhD, Full Professor*

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Србија,
*Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrad, Serbia*

Др Наташа Голић, научни саветник

*Nataša Golić PhD, Full Research Professor*

Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (ИМГГИ),
Универзитет у Београду, Србија
*Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE),*
*University of Belgrade, Serbia*

Др Сара Пансери, ванредни
професор

*Sara Panseri PhD, Associate Professor*

Департман за ветеринарску медицину, Универзитет у Милану, Италија.
*Department of Veterinary Medicine and Animal Science (DIVAS),*
*University of Milan, Italy.*

***NAPOMENA:*** Članovi komisije moraju biti jedinstveni u svom mišljenju
* za kandidate koji nisu upisani na doktorske akademske studije