

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ
35/472
(Број захтева)

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ НАУКА
(Назив већа научне области и коме се захтев упућује)

06.10.2016.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Примена 7C2C5 моноклонског антитела у развоју ELISA тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита које носе имунодоминантни епитоп“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

МАРИЈА (Љубомир) ГЊАТОВИЋ (рођена Девих), дипл. инж. технологије

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање: Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

3. Година дипломирања: 2009.

Студент је шк. 2009/2010. године уписан на докторске академске студије.

На захтев студента декан Факултета донео је Решење број 05-10/32 од 07.11.2014. године о одобрењу мировања права и обавеза у шк. 2014/2015. години због неге детета до годину дана, на основу поднетих докумената.

На захтев студента, а уз сагласност ментора, декан Факултета донео је Решење број 20/130 од 06.10.2016. године о продужењу рока за завршетак студија за два семестра шк. 2016/2017. године.

Обавештавамо Вас да је Наставно-научно веће,
(назив надлежног тела Факултета)

на седници одржаној 29.09.2016. године размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

ДП

На основу чл. 30. став 3. Закона о високом образовању, чл. 40. Статута ТМФ-а и чл. 32. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 29.09.2016. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата
за израду докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације МАРИЈЕ ГЊАТОВИЋ (рођене Девић), дипл. инж. технологије, под називом: „Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ELISA тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита које носе имунодоминантни епитоп“.

Одлуку о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације доноси Универзитет у Београду.

За ментора се одређује др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Одлуку доставити: Универзитету у Београду на сагласност, кандидату, ментору, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата: Марија Љ. Гњатовић

Име и презиме ментора: Бранко Бугарски

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Balanc, B., Kalusevic, A., Drvenica, I., Coelho, M., T., Djordjevic, V., Alves, V., Sousa, I., Moldao-Martins, M., Rakic, V., Nedovic, V., Bugarski, B. (2016). Calcium-Alginate-Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract. Journal of food science, E65-E75, ISSN 0022-1147, IF 2.315
2. Balanc, B., Trifkovic, K., Djordjevic, V., Markovic, S., Pjanovic, R., Nedovic, V., Bugarski, B. (2016). Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. Food hydrocolloids, 832-842, ISSN 0268-005X, IF 4.703
3. Drvenica, I., Bukara, K., Ilic, V., Misic, D., Vasic, B., Gajic, R., Djordjevic, V., Veljovic, Dj., Belic, A., Bugarski, B. (2016). Biomembranes from slaughterhouse blood erythrocytes as prolonged release systems for dexamethasone sodium phosphate. Biotechnology progress, 1046-1055, ISSN 8756-7938, IF 2.272
4. Belcak-Cvitanovic, A., Djordjevic, V., Karlovic, S., Pavlovic, V., Komes, D., Jezek, D., Bugarski, B., Nedovic, V. (2015). Protein-reinforced and chitosan-pectin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract. Food hydrocolloids, 361-374, ISSN 0268-005X, IF 4.703
5. Petrovic, P., Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Zizak, Z., Vukovic, N., Sekularac, G., Drmanic, S., Bugarski, B. (2016). Biological potential of puffballs: A comparative analysis. Journal of functional foods, 36-49, ISSN 1756-4646, IF 4.269

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техникотехнолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно

се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41 и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односно дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Датум: 09.09.2016

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Одлуком бр. 35/267 од 26.05.2016. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Марије Љ. Гњатовић за израду докторске дисертације и научне заснованости теме:

Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ELISA тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита које носе имунодоминантни епитоп

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Марија Љ. Гњатовић (рођена Девећ) рођена је 19.07.1983. године у Смедереву, где је завршила основну школу и Гимназију. Студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду започела је школске 2002/2003. године, на смеру Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Звање дипломирани инжењер технологије стекла је маја 2009.

1.2. Сечено научноистраживачко искуство

Школске 2009/2010. године уписала је докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм: Биохемијско инжењерство и биотехнологија, под менторством др Бранка Бугарског, редовног професора. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија, укључујући и завршни испит под називом „Структурне и функционалне карактеристике нормалних и моноклонских имуноглобулина – технологија производње и изолације“.

Предмети	ESPB	Oцена
1. Феномени преноса у биолошким системима	5	10
2. Хемијска кинетика	5	10
3. Математичка обрада експерименталних података	5	7
4. Одабрана поглавља биохемије-витамини	5	10
5. Специјална поглавља преноса масе	4	10
6. Инжењерство ћелије	5	10
7. Виши курс аналитичке хемије	5	10
8. Физичко-хемијске основе фармацеутског инжењерства	4	10
9. Санитарна микробиологија	4	10
10.Вишефазни системи	5	10
11.Одабрана поглавља пројектовања процеса у биохемијском инжењерству	5	10
12. Završni ispit	30	10

Од 01.01.2011. године Марија Љ. Ѓњатовић запослена је на Институту за примену нуклеарне енергије - ИНЕП, Београд, на Одељењу за имунологију и имунопаразитологију. Ангажована је на пројекту финансираном од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије али и у оквиру услужне делатности института, која обухвата производњу и развој имунодијагностичких комплета и биомедицинских препарата.

Истраживачка звања:

16.03.2011. Истраживач приправник

27.04.2012. Истраживач сарадник

Пројекти:

Национални пројекти:

2011. – „Изучавање имунског одговора на инфекцију или продукте паразита и њихов утицај на модулацију и/или превенцију других болести“ Б173047

Иновациони пројекти:

2014-2015., – „Производња и примена биоактивних протеина и пептида сурутке и млека", 451/03/2802/2013-16/176

Курсеви и друга стручна усавршавања:

- 09-12.септембар 2012., FEBS International Summer School : Sofia school of protein science - Structure and dynamics of biological macromolecules, Софија, Бугарска (FEBS стипендија)
- 25-29. мај 2015. Школа протеомике: теоријски и практични основе, Хемијски факултет, Београд
- 05-15.јул 2013. Стручно усавршавање на тему „Развој и валидација ЕЛИСА тестова“, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy (Европска референтна лабораторија за паразите, Рим, Италија)

Чланство у научним друштвима:

- Српско хемијско друштво
- Биохемијско друштво Србије
- Друштво паразитолога Србије

Страни језици:

- Енглески језик-активно познавање језика
- Руски језик-активно познавање језика

Радови, конгресна саопштења и техничка и развојна решења из уже научне области:

Рад у истакнутом међународном часопису M22

1. Radovic I, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Cvetkovic J, Mojsilovic S, Devic M, Sofronic-Milosavljevic Lj. Immunomodulatory effects of Trichinella spiralis-derived excretory-secretory antigens. Immunologic research 2015; 61: 312-325, IF(2015)=3.330 (ISSN 0257-277X)
2. Mihajlovski K, Carevic M, Devic M, Siler-Marinkovic S, Rajilic-Stojanovic M, Dimitrijevic-Brankovic S. Lignocellulosic waste material as substrate for Avicelase production by a new strain of Paenibacillus chitinolyticus CKS1. International biodeterioration & biodegradation 2015; 104: 426-434, IF(2015)= 2.593 (ISSN 0964-8305)
3. Stojanovic R, Ilic V, Manojlovic V, Bugarski D, Devic M, Bugarski B. Isolation of Hemoglobin from Bovine Erythrocytes by Controlled Hemolysis in the Membrane Bioreactor. Applied biochemistry and biotechnology 2012; 6; 1491-1506, IF(2012)=1.879 (ISSN 0273-2289)

Рад у међународном часопису M23

4. Dević M, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic Lj. Detection of a *Trichinella*-specific IgE in human trichinellosis - the creation of a new test. Journal of the Serbian chemical society 2014; 79: 1477-1490, IF(2014)=1.009 (ISSN 0352-5139)

Техничка и развојна решења M81

5. Rakin M, Vukašinović-Sekulić M, Zarić D, Jorga J, Radulović Z, Bulatović M, Krunić T, Gnjatović M, Borić M, Vasilevska R, Janačković B, Stamenković M.: Unapređenje funkcionalnih karakteristika fermentisanog napitka od surutke i mleka dodatkom bioaktivnih peptida", Tehničko rešenje realizovano u okviru Inovacionog projekta pod nazivom "Proizvodnja i primena bioaktivnih proteina i peptida surutke i mleka", ev. broj 451/03/2802/2013-16/176 finansiranog od strane Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i prihvaćeno od strane AD Bimlek, Makedonija kao krajnjeg korisnika. Tehničko rešenje je odobreno na NN veću Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, na 29. sednici održanoj 09.07.2015.

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја M34

6. Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Cvetkovic J, Dević M, Vasilev S, Sofronic-Milosavljevic Lj. Individual components of *Trichinella spiralis* excretory-secretory muscle larvae antigens – the role in shaping of the immune response. 14th International Conference on Trichinellosis, ICT14, Berlin, Nemačka, 14-18 septembar 2015. Abstract book p 34.
7. Vasilev S, Korovljev A, Doroslovac M, Djordjevic M, Trailovic I, Dević M, Sofronic-Milosavljevic Lj. Trichinellosis in Serbia, evidence on long lasting antibody presence - pilot study. 14th International Conference on Trichinellosis, ICT14, Berlin, Nemačka, 14-18 septembar 2015. Abstract book p 148.
8. Miladinović-Tasic N, Sofronic-Milosavljevic Lj, Vasilev S, Ristović N, Dević M, Otašević S. Serological diagnosis of trichinellosis during two outbreaks in the territory of southeast Serbia. 14th International Conference on Trichinellosis, ICT14, Berlin, Nemačka, 14-18 septembar 2015. Abstract book p 71.
9. Radovic I, Gruden-Movsesijan A, Cvetkovic J, Dević M, Mojsilovic S, Ilic N, Sofronic-Milosavljevic L. *Trichinella spiralis* muscle larvae products induce large proportion of CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ T cells – possible role in amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. 9th International Congress on Autoimmunity, Nice, France, 26-30 March, 2014. Abstract book p100.

10. Dević M, Radović I., Gruden-Movsesijan A., Ilic N., Sofronić-Milosavljević Lj. Novel ELISA test for detection of *Trichinella*-specific IgE antibodies. 47. Dani preventivne medicine, 24-27. Septembar 2013., Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu; Srbija, Abstract book , p 158

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током последипломских студија и у оквиру научно-истраживачког рада на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, Б173047 (2011-), Марија Љ. Гњатовић, дипл. инжењер технологије, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Такође, тема докторске дисертације припада области из које је кандидат аутор и коаутор два научна рада штампана у међународним часописима, и 5 саопштења на међународним скуповима, што указује на то да је кандидат врло компетентан за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет истраживања

На пољу имунопаразитологије, праћење инциденције и преваленције инфекције паразитом из рода *Trichinella* код људи и животиња од изузетног је значаја, због чињенице да ова инфекција представља озбиљан проблем широм света, а нарочито у земљама Централне и Источне Европе. Основни недостатак тренутно доступних комерцијалних ELISA тестова, нарочито оних који су намењени дијагностици хумане трихинелозе, али и откривању антитела код инфицираних свиња, коња и других животиња којима се људи хране, је њихова ограничена специфичност. Наиме, могуће је појављивање укрштене реакције са антителима специфичним према другим паразитима, односно добијање лажно позитивног резултата у случају истовременог постојања неке друге инфекције. Узрок томе лежи у чињеници да ови тестови као специфични антиген за детекцију анти- *Trichinella* антитела у индиректном ELISA систему користе пун екскреторно - секреторни антиген мишићних ларви *T. spiralis* (ES L1) који поред компоненти карактеристичних за овог паразита, садржи и еволутивно конзервиране детерминанте које су заједничке за различите организме почев од бактерија, преко протозоа до других паразита и најсложенијих организама, а неке од њих су сличне са појединим аутоантигенима људи. Валидацијом више врста

комерцијално доступних ELISA тестова као и оних развијених за потребе истраживачког рада, дошло се до закључка да је осетљивост оваквих тестова 100% уколико се антитела детектују у периоду од 1,5 до 4 месеца након инфекције, међутим, запажена је знатно мања осетљивост приликом анализе узорака добијених у краћем периоду након инфекције (сензитивност око 75%). Компоненте које се најчешће користе за детекцију везаних антитела у индиректним ELISA системима, ензимски обележен протеин А, G, као и антитела специфична према имуноглобулину G домаћина, нису у могућности да детектују све класе и субкласе антитела које се уобичајено јављају на почетку инфекције, што директно утиче на сензитивност теста.

Праћење једног од потенцијалних маркера ране дијагностике хумане трихинелозе било би омогућено развојем поузданог теста за детекцију специфичних IgE антитела према *Trichinella spp.* и хуманим серумима, будући да такви тестови комерцијално нису доступни, док је сензитивност тестова приказаних у литератури, развијених за потребе научног рада, на незадовољавајућем нивоу (35-75%). Проблем у детекцији специфичних IgE антитела лежи у чињеници да је ова класа антитела заступљена у далеко мањем проценту у односу IgG класу антитела, тако да у индиректним ELISA тестовима долази до блокирања антиген везујућих места на површини микротитрационих плоча од стране специфичних IgG антитела, што представља основни узрок добијања лажно негативних резултата у детекцији специфичних IgE антитела.

Хронична инфекција паразитом *T. spiralis* карактерише се продукцијом поликлонских антитела специфичних према антигенима *T. Spiralis* од стране Б лимфоцита који су под контролом Т ћелија. Тај Т ћелијски одговор у хроничној инфекцији представља мешовити Th1/Th2 имунски одговор уз преминацију Th2 типа праћену покретањем регулаторне мреже имунског одговора. Сматра се да овакав профил одговора обезбеђује ES L1 антиген паразита који се продукује у хроничној фази инфекције и помоћу кога паразит модулише имунски одговор домаћина и тиме обезбеђује свој дуготрајан опстанак у истом организму. Пошто су протеини ES L1 антигена које препознаје 7C2C5 mAb носиоци имунодоминантног епитопа карактеристичног за генус *Trichinella*, било би значајно да се испита потенцијал фракције антигена изоловане помоћу ових антитела да покрене имунски одговор који одговара профилу одговора активiranог са укупним антигеном односно одговора који карактерише хроничну инфекцију са *T. spiralis*. С обзиром да су дендритке ћелије (Дћ)

најпотентније антиген-презентујуће ћелије у организму задужене за покретање имунског одговора, оптималан систем за проверу оваквог капацитета протеина из састава ES L1 антигена, изолованих помоћу 7C2C5 mAt, био би *in vitro* стимулација ДТ изолованим протеинима и праћење фенотипа и цитокинске продукције третираних ћелија у поређењу са ефектом који на ДС има пуни антиген. Резултати ових испитивања били би значајни у дефинисању молекула пореклом од паразита који имају највећи имуномодулаторни потенцијал.

Циљеви истраживања

- 1. Испитивање дијагностичког потенцијала 7C2C5 mAt кроз развој два ELISA теста.**
 - ELISA тест за детекцију свих класа *Trichinella*-специфичних антитела код људи и животиња
 - ELISA тест за детекцију специфичних IgE антитела према *Trichinella spp.* у хуманим серумима
- 2. Изолација и карактеризација протеина идентификованих помоћу 7C2C5 mAt. Дефинисање улоге наведених протеина у покретању и усмеравању имунског одговора на моделу хуманих дендритских ћелија *in vitro*.**

Преглед литературе:

1. Pozio E., E. Hoberg, G. la Rosa, D. S. Zarleng, Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus, *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (2009), 606–616
2. Pozio E., D.S. Zarlenga. New pieces of the *Trichinella* puzzle. *International Journal for Parasitology*, 43 (2013), 983–997.
3. Gamble H.R., E. Pozio, F. Bruschi, K. Nocler, C.M.O. Kapel, A.A. Gajdhar, International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man, *Parasite*, 11 (2004), 3-13
4. World Organisation for Animal Health. 2008. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases, p. 34-45. In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. World Organisation for Animal Health, Paris, France.
5. Gottstein B., E. Pozio, K. Nöckler, Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (2009), 127–145.

6. Gamble H.R, C.E. Graham, Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis, *American Journal of Veterinary Research*, 45 (1984), 67-74.
7. Ortega-Pierres M.G., L. Yepez-Mulia, W. Homan, H. R. Gamble, P. L. Lim, D. I. Wassom, J. A. Appleton, Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite, *Parasite Immunology*, 18 (1996), 273-284
8. Gomez-Morales, M. A., A. Ludovisi, M. Amati, et al. A distinctive Western blot pattern to recognize *Trichinella* infections in humans and pigs. *International Journal for Parasitology*, 42 (2012), 1017–1023.
9. Ilić N, A. Gruden-Movsesijan, M. Zivojinovic, L. Sofronic-Milosavljevic, Characteristic band pattern in western blots for specific detection of anti-*Trichinella spiralis* antibodies in different host species, *Acta Veterinaria*, 64 (2014), 33-43.
10. Gomez-Morales M.A., A. Ludovisi, M. Amati, S. Cherchi, P. Pezzotti, E. Pozio, Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Trichinellosis, *Clinical and Vaccine Immunology*, 15 (2008), 1723–1729
11. Gamble et al., Diagnostic Reagent for Swine Trichinosis, United States Patent, number 4,670,384, 1987
12. Watanabe N., F. Bruschi, M. Korenaga, IgE: a question of protective immunity in *Trichinella spiralis* infection, *Trends in Parasitology*, 21 (2005), 175-178
13. Negrão-Corrêa D., Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* , 43 (2001), 291-299
14. Watanabe N., IgE in helminth infections, *Progress of Medical Parasitology in Japan*, 7 (1999), 321–338
15. Jaoko W. G., M. Lund, E. Michael, P. E. Simonsen, A simple and quick method for enhanced detection of specific IgE in serum from lymphatic filariasis patients, *Acta Tropica*, 80(2001), 51-57
16. Mamoni R. L., C. L. Rossi, Z. P. Camargo, M. H. S. L. Blotta, Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin e in sera of patients with paracoccidioidomycosis, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65 (2001), 237-241

17. Bruschi, F., L. Chiumiento, Immunomodulation in Trichinellosis: Does *Trichinella* really escape the host immune system?, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 12 (2012), 4-15.
18. Gruden-Movsesijan, A., N. Ilic, M. Colic, I. Majstorović, S. Vasilev, L. Sofronic-Milosavljević, The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2011, 34: 429-439.
19. Radovic I., A. Gruden-Movsesijan, N. Ilic, J. Cvetkovic, S. Mojsilovic, M. Devic, L. Sofronic-Milosavljevic, Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory-secretory antigens. *Immunologic Research*, 61 (2015), 312-325.
20. Sofronic-Milosavljevic L., I. Radovic, N. Ilic, I. Majstorovic, J. Cvetkovic, A. Gruden-Movsesijan, Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Medical microbiology and immunology*, 202 (2013), 239-49.
21. Sofronic-Milosavljevic L., N. Ilić, E. Pinelli, A. Gruden-Movsesijan, Secretory Products of *Trichinella spiralis* muscle larvae and immunomodulation: Implication for autoimmune diseases, allergies, and malignancies, *Journal of Immunology Research*, Volume 2015
22. van Stijn, C., S. Meyer, M. van den Broek, S. Bruijns, Y. van Kooyk, R. Geyer, I. van Die, *Schistosoma mansoni* worm glycolipids induce an inflammatory phenotype in human dendritic cells by cooperation of TLR4 and DC-SIGN. *Molecular Immunology*, 47 (2010), 1544-1552.
23. Aranzamendi, C., F. Fransen, M. Langelaar, F. Franssen, P. van der Ley, J.P. van Putten, V. Rutten, E. Pinelli, *Trichinella spiralis*-secreted products modulate DC functionality and expand regulatory T cells in vitro, *Parasite Immunology*, 34 (2012), 210-223.
24. Colonna, M., B. Pulendran, A. Iwasaki, Dendritic cells at the host-pathogen interface, *Nature Immunology*, 7 (2006), 117–120.
25. MacDonald, A.S., R.M. Maizels, Alarming dendritic cells for Th2 induction, *Journal of Experimental Medicine*, 205 (2008), 13-17.
26. Steinman, R.M., D.Hawiger, M.C. Nussenzweig, Tolerogenic dendritic cells, *Annual Review of Immunology*, 21 (2003), 685–711.

3. ПОЛАЗНЕ ХИПОТЕЗЕ

Имуноблот анализом серума људи и животиња инфицираних паразитом из рода *Trichinella* утврђено је да, без обзира на порекло, сви серуми реагују са три протеинске траке од 45, 49 и 53 kDa, што указује да ови протеини (који припадају групи TS L1 антигена *Trichinella*) носе имунодоминантни епитоп који покреће стварање специфичних антитела. Исти епитоп на поменутим протеинским тракама, који је раније дефинисан као епитоп карактеристичан искључиво за генус *Trichinella*, препознаје и моноклонско антитело 7C2C5 (mAt). Моноклонско антитело 7C2C5 и протеини, идентификовани помоћу анти – *Trichinella* антитела присутних у серумима различитих врста, односно протеини препознати од стране 7C2C5 mAt, представљају добре кандидате за примену у имунодијагностици али и за испитивање њихове улоге у покретању и усмеравању имунског одговора.

Развој универзалног конкуритивног ELISA теста за детекцију свих класа *Trichinella*-специфичних антитела у серумима људи и животиња

Да би неко моноклонско антитело било добар кандидат за примену у конкуритивном ELISA тесту мора бити специфично према високо конзервираном епитопу патогена. Такође, епитоп кога mAt препознаје мора бити препознат и од стране специфичних серумских антитела током читавог тока инфекције паразитом. Како су у случају 7C2C5 mAt оба наведена услова испуњена, испитаће се могућност примене 7C2C5 mAt у конкуритивном систему.

У директном конкуритивном ELISA моделу, ензимски обележено mAt-7C2C5 би се налазило у конкуренцији са *Trichinella*-специфичним антителима из серума за исто везно место на понуђеним ES L1 антигенима везаним за чврсту фазу. Мерљиви сигнал у ELISA био би обрнуто пропорционалан концентрацији специфичних антитела присутних у серумима и заснован искључиво на интеракцији специфични епитоп-7C2C5 mAt чиме се у потпуности искључује могућност детектовања неспецифичних интеракција. Поред повећане специфичности, предност овако постављеног теста била би и у повећаној сензитивности јер се у систему детектују све каласе и субкласе специфичних антитела једнаким интензитетом, што је веома значајно за дијагностику антитела у почетним фазама инфекције. Коришћењем ензимски обележених mAt као конкуритивних и детекционих у исто време, трајање извођења теста се значајно смањује,

поступак извођења теста поједностављује, а могућност настанка манипулативних грешака своди на минимум.

Развој ELISA теста за детекцију специфичних IgE антитела према *Trichinella spp.* у хуманим серумима

Проблем конкуренције *Trichinella*-специфичних IgE антитела са *Trichinella*-специфичним IgG антителима био би решен увођењем у тест моноклонског антитела специфичног према хуманом IgE антителу. Ово mAt би било адсорбовано на површини микротитрационих плоча и везивало би укупни хумани IgE из серума, чиме би се већ у првом кораку ELISA теста елиминисале друге класе антитела присутне у испитиваним серумима. Детекција *Trichinella* специфичних IgE антитела остварила би се инкубацијом са ES L1 антигеном *T. spiralis*, а везани ES L1 антиген би био детектован употребом ензимски обележеног 7C2C5 mAt. Тако би се применом анти-IgE mAt решио проблем сензитивности, док би се применом 7C2C5 mAt решио проблеме неспецифичности.

Испитивање имуномодулаторног потенцијала фракције протеина изоловане применом 7C2C5 mAt (7C2C5 Ag)

Дендритске ћелије су најважније професионалне антиген презентујуће ћелије које имају централну улогу у детерминисању Т ћелијског типа имунског одговора, због чега су многа истраживања која испитују потенцијалну имуномодулаторну улогу молекула концентрисана на DC. У контакту са страним агенсима DC сазревају, а њихово сазревање праћено је фенотипским и функционалним променама. Зреле DC, које настају под утицајем бактеријских, вирусних или протозоалних антигена, карактеришу се повећаном експресијом MHC II и костимулаторних молекула, као и повећаном продукцијом про-инфламаторних цитокина IL-6, IL-12, IL-23 и TNF- α , што води ка Th1 поларизацији. Механизми поларизације ка Th1 типу имунског одговора су у великој мери објашњени, док се подаци о томе како DC усмеравају имунски одговор ка Th2 и регулаторном типу још увек прикупљају. Досадашњи резултати, углавном добијени на експерименталном моделу хелминтских инфекција, указују да DC под утицајем хелминтских антигена не сазревају на конвенционалан начин, већ остају незреле или задобијају фенотип делимично зрелих ћелија које експримирају низак ниво MHC II, костимулаторних молекула и проинфламаторних цитокина. Ипак, ове ћелије задржавају способност да изврше поларизацију наивних Т лимфоцита.

Наша досадашња истраживања на анималним моделима су показала да ES L1 антиген индукује непотпуно сазревање DC и поларизује имунски одговор у правцу Th2

и/или регулаторног одговора, али се не зна ништа о томе које компоненте у оквиру ES L1 антигена су одговорне за такав ефекат на имунски одговор. Претпоставља се да се применом протеина препознатих од стране 7C2C5 mAt из састава ES L1 Ag, за које је раније показано да су носиоци имунодоминантног епитопа, може постићи исти ефекат на покретање и усмеравање имунског одговора као и применом укупног антигена ES L1, што ће бити испитано на моделу хуманих ДТ *in vitro*.

4. НАУЧНЕ МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

За остваривање постављених циљева – предлаже се следећа методологија

1. Производња и изолација моноклонског антитела 7C2C5 из асцита

- Гајење ћелија хибридома линије 7C2C5 у *in vitro* условима и њихова апликација у високо сродне мишеве ради стварања тумора, добијање и изоловање асцита у коме се mAt налазе у високој концентрацији погодной за даљи рад.
- Провера имунореактивности 7C2C5 mAt које асцит садржи применом Western blot технике.
- Изолација моноклонског антитела из асцита применом технике таложења амонијум сулфатом (делимично пречишћавање) и гел филтрације.
- Провера квалитета тј. испитивање имунореактивности изолованих антитела у индиректном ЕЛИСА систему (са ЕС Л1 антигеном везаним на чврстој фази и коришћењем поликлонских овца-анти миш антитела обележених са ензимом - пероксидазом из рена- ХРПО, као секундарног реагенса).
- Обележавање моноклонских антитела 7C2C5 са пероксидазом из рена (HRPO) применом NaIO₄, за примену у ЕЛИСА тестовима

2. Изоловање и карактеризација протеинских компонената препознатих од стране 7C2C5 mAt из ES L1 Ag *T.spiralis*

- Активација матрикса - Sepharose 4B за афинитивно изоловање применом CNBr, и имобилизација 7C2C5 mAt на активираним матриксу
- Афинитивно хроматографско изоловање протеинске смеше у чијем саставу се налази имунодоминантни епитоп, применом 7C2C5 mAt као лиганда за везивање. Фракције ће бити изоловане из ES L1 антигена *T.spiralis*.
- Тестирање изолованих фракција применом 1D електрофорезе, Western blot технике и течне хроматографије високих перформанси (HPLC) помоћу аналитичке C-18 колоне

3. Развој ELISA тестова

- Дефинисање референтних серума и материјала за развој и валидацију ELISA тестова за откривање антитела против *Trichinella spp.*
- Дефинисање оптималних улова извођења ELISA тестова (оптимизација припремљених компоненти и параметара протокола, са посебним освртом на све параметре који могу утицати на резултат теста: температура, мешање, волумен и концентрације свих компоненти теста, утицај афинитета антитела на процес компеиције)
- Дефинисање дијагностичких параметара теста - одређивање cut-off вредности теста, испитивање дијагностичке сензитивности и специфичности тестова применом ROC-CURVE анализе.
- Евалуација теста анализом хуманих серума и серума експерименталнио инфицираних коња и свиња.
- Дефинисање калибрационе криве за одређивање концентрације *Trichinella*-специфичаних IgE антитела

4. За остваривање постављеног циља – Испитивање улоге 7C2C5-антигена у покретању и усмеравању имунског одговора *in vitro*, предлаже се следећа методологија:

- Изоловање моноклеарних ћелија периферне крви из крви добровољних даваоца, сепарацијом на градијенту
- *In vitro* култивација хуманих DC из моноцита.и стимулација добијених DC антигенима: ES L1, 7C2C5-Ag, LPS (ендотоксин-липополисахарид).
- Одређивање фенотипских карактеристика DC применом FACS анализа (анализа на проточном цитофлуориметру) у циљу мерења експресије површинских молекула коришћењем следећих моноклонских антитела: анти-MHC II, анти-CD40, анти-CD83 и анти-CD86.
- Одређивање функционалних карактеристика DC мерењем нивоа цитокина (IL-10, IL-12p70, TGF β) у културама DC након култивације са антигенима, применом ELISA тестова.

5. ОЧЕКИВАНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

- Употребом моноклонских антитела 7C2C5 у конкуритивном ELISA моделу за детекцију *Trichinella*-специфичних антитеала, добио би се тест значајно повећане специфичности и сензитивности у односу на све постојеће ELISA тестове који имају исту намену. Такође, овако конструисан тест, био би једини универзални тест који би омогућавао детекцију специфичних антитела у серумима људи или животиња, коришћењем потпуно истих компоненти теста, протокола и постављених дијагностичких параметара теста.
- Употребом оваког теста у пракси смањио би се један од највећих ризика коришћења постојећих ELISA тестова, а то су лажно позитивни резултати и дијагнозе који су последица недовољне специфичности тестова, као и лажно негативни резултати као поседица недовољне осетљивости тестова у почетним фазама инфекције.
- Кроз развој конкуритивног ELISA теста и анализу свих парамеата који могу утицати на процес конкуренције, у потпуности би био сагледан овај феномен што би омогућило коришћење стечених знања у сврху развијања и производње нових дијагностичких тестова.
- Испитивање улоге специфичних IgE антитела у инфекцији са *T.spirallis* веома је отежано непостојањем поузданог теста који би се користио у њиховој детекцији. Значајан научни допринос био би остварен развојем ELISA теста повећане сензитивности који би омогућио поуздано праћење концентрације специфичних IgE антитела у серумима пацијената оболелих од трихинелозе. Подаци добијени на тај начин би омогућили боље сагледавање дијагностичког значаја овог параметра за који се сматра да може бити маркер ране фазе инфекције. Такође, истраживања могу бити усмерена и ка испитивању потенцијалне протективне улоге специфичних IgE антитела, анализом корелације између концентрације присутних IgE антитела и тежине клиничке слике пацијената, што је већ показано на анималним моделима.
- Важно је поменути да би кроз развој ELISA теста за детекцију специфичних IgE антитела, био приказан потпуно нови приступ у решавању проблема конкуренције антиген везујућих места концентрацијски доминантнијим IgG

антителима, а који се веома често јавља у детекцији мање заступљених антитела применом ELISE и сличних тестова.

- Значај испитивања улоге 7C2C5 антигена у покретању имунског одговора *in vitro* лежи у дефинисању компоненти ESL1 антигена које су кључне за покретање и усмеравање имунског одговора преко DC, а које имају потенцијалну имуномодулаторну функцију, како би се та сазнања могла искористити за креирање нових терапеутских приступа у лечењу инфламаторних поремећаја.

6. ПЛАН ИСТРАЖИВАЊА И СТРУКТУРА РАДА

Предвиђа се да предложена докторска дисертација буде организована по следећим поглављима: Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература.

У поглављу Увод биће дефинисан предмет и циљ истраживања.

Теоријски део докторске дисертације обухватиће преглед и анализу доступне литературе која ће бити приказана кроз следећа поглавља:

1. Паразит *T.spiralis*
2. Антигени паразита *T.spiralis*, карактеризација антигена применом моноклоналних антитела
3. Улога ES L1 антигена паразита и његових компонената на покретање и усмеравање имунског одговора.
4. Моноклонско антитело 7C2C5, специфично према имунодоминантном епитопу *T.spiralis*
5. Примена серологије у дијагностици инфекције домаћина паразитом *T.spiralis*, ELISA тестови, развој и валидација ELISA тестова

У Експерименталном делу биће наведени:

1. Хемикалије и материјали употребљени у раду
2. Опис експерименталних техника

У поглављу Резултати и дискусија биће представљени и дискутовани резултати експеримената:

Компетитивни ELISA тест

1. Дефинисање оптималних услова за извођење теста кроз анализу и приказ утицаја различитих параметара на резултат ЕЛИСА теста.
2. Приказ резултата ROC curve анализе коришћене за дефинисање дијагностичких параметара теста.
3. Приказ резултата валидације (евалуације) ELISA теста добијених анализом серума људи, али и свиња и коња природно и експериментално инфицираних.

ELISA тест за детекцију *Trichinella*-специфичних IgE антитела

1. Дефинисање оптималних услова за извођење теста кроз анализу и приказ утицаја различитих параметара на резултат ЕЛИСА теста.
2. Приказ калибрационе криве за одређивање концентracије анализираних серума
3. Испитивање дијагностичког значаја овог параметра кроз анализу серума пацијената код којих су детектована *Trichinella*-специфична IgG антитела, са повећаним и нормалним вредностима укупног IgE

Изолација и карактеризација протеина идентификованих помоћу 7C2C5 mAb

1. Приказ резултата добијених анализом изоловане протеинске фракције применом 1D електрофорезе, Western blot технике и течне хроматографије високих перформанси (HPLC)

Дефинисање улоге наведених протеина у покретању и усмеравању имунског одговора на моделу хуманих дендритских ћелија *in vitro*.

1. Приказ мерења експресије површинских молекула: MHC II, CD40, CD83 и CD86.
2. Приказ цитокинског профила (IL-10, IL-12p70, TGF β) у културама DC након култивације са антигенима, применом ELISA тестова.

У Закључку ће резултати добијени у току истраживања бити сумирани уз стављање акцента на њихове основне научне доприносе.

Литература ће садржати наводе цитиране у раду и публикације проистекле из истраживачког рада ове докторске тезе.

7. ЗАКЉУЧАК ПРЕДЛОГ

На основу изложеног Комисија сматра да је тема докторске дисертације коју је предложила Марија Љ Ђатовић, дипл. инж., научно заснована и да представља значајан допринос ужој научној области Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидату Марији Љ.Ђатовић одобри израду докторске дисертације под насловом „Примена 7C2C5 моноклонског антитела у развоју ELISA тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита које носе имунодоминантни епитоп“. За ментора докторске дисертације комисија предлаже др Бранка Бугарског, ред. проф. Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду,

године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

др Љиљана Софронић-Милосављевић, научни саветник
Универзитет у Београду, Институт за примену нуклеарне
енергије-ИНЕП

др Алиса Груден-Мовсесијан, научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за примену нуклеарне
енергије-ИНЕП