

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

**Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Марије Љ. Гњатовић (рођ. Девић), дипл. инг.**

**Одлуком бр. 35/195 од 31.05.2018. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Марије Љ. Гњатовић (рођ. Девић), дипл. инг. под насловом**

**„Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе имунодоминантни епитоп“.**

**После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи**

**РЕФЕРАТ**

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

10.04.2016. – Кандидат Марија Љ. Гњатовић, дипл. инг., предложила је тему докторске дисертације под називом: „Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе имунодоминантни епитоп“.

26.05.2016. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је одлука о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Марије Љ. Гњатовић, дипл. инг. за израду докторске дисертације под називом: „Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе имунодоминантни епитоп“.

29.09.2016.- На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је одлука о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобравању израде докторске дисертације Марије Љ. Гњатовић, дипл. инг., под називом: „Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе имунодоминантни епитоп“, а за менторе ове докторске дисертације именовани су др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду и др Љиљана Софронић-Милосављевић, научни саветник Института за примену нуклеарне енергије-ИНЕП, Универзитет у Београду.

31.10.2016. – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Марије Љ. Гњатовић, дипл. инг., под називом: „Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју

ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе имунодоминантни епитоп“.

31.05.2018. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/195 о именовану Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Марије Љ. Гњатовић, дипл. инг., под називом: „Примена 7C2C5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе имунодоминантни епитоп“

Кандидат Марија Љ. Гњатовић, уписала је докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, школске 2009/2010. године.

## 1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство (ужа научна област – Биохемијско инжењерство и биотехнологија), за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. За менторе ове докторске дисертације именовани су др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду и др Љиљана Софронић-Милосављевић, научни саветник Института за примену нуклеарне енергије-ИНЕП, Универзитета у Београду.

Ментор др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду из ове области публиковао је преко 20 радова у часописима који су на СЦИ листи. Руководио је израдом 12 одбрањених докторских дисертација, што говори о компетентности ментора да руководи израдом ове докторске дисертације.

Ментор др Љиљана Софронић-Милосављевић, научни саветник института за примену нуклеарне енергије ИНЕП, Универзитета у Београду, из ове области публиковао је 20 радова у часописима који су на СЦИ листи. Руководио је израдом 3 одбрањене докторске дисертације, што говори о компетентности ментора да руководи израдом ове докторске дисертације.

## 1.3. Биографски подаци о кандидату

Кандидат Марија (Љубомир) Гњатовић (рођ. Девић), дипломирани инжењер технологије, рођена је 19.07.1983. године у Смедереву, Република Србија, где је стекла основно и средње образовање. Уписала је Технолошко–металуршки факултет Универзитета у Београду 2002. године, а дипломирала је 2009. године на смеру Биохемијско инжењерство и биотехнологија са просечном оценом 8,00. Дипломски рад на тему „Уклањање Cd(II) јона из воде помоћу угљеничних наноцеви“ одбранила је са оценом 10,00. Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, уписала је школске 2009/2010. године. У септембру 2012. одбранила је завршни испит под називом „Структурне и функционалне карактеристике нормалних и моноклонских имуноглобулина – технологија производње и изолације“ са оценом 10. У оквиру докторских студија положила је све испите предвиђене студијским програмом, са просечном оценом 9,77.

Од 01.01.2011. (7 год.) године запослена је на Институту за примену нуклеарне енергије - ИНЕП, као истраживач приправник, а од априла 2012. године прелази у звање истраживач сарадник. Ангажована је на пројекту основних

истраживања под називом „Изучавање механизма имунског одговора на инфекцију или продукте паразита и њихов утицај на модулацију и/или превенцију других болести“, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (број пројекта: 173047Б). Била је учесник и на националном иновационом пројекту „Производња и примена протеина и пептида сурутке и млека“ (број пројекта: 451/03/2802/2013-16/176). Поред овога, учесник је и на два међународна пројекта, *the European Cooperation in Science and Technology (COST) Action BM1305: Action to Focus and Accelerate Cell-based Tolerance-inducing Therapies (A FACTT) (2014-2018)* и *FA COST Action FA1408: A European Network for Foodborne Parasites (2015-2019)*.

У оквиру производне и услужне делатности института на коме ради, Марија Љ. Ђатовић ангажована је на пољу производње и развоја имунодијагностичких тестова намењених детекцији паразитских и аутоимунских болести. У оквиру производног процеса бави се изоловањем и карактеризацијом пречишћених антигена који се користе у поступку имунизације животиња, производњом и изолацијом поликлонских и моноклонских антитела, везивањем антитела и антигена за чврсту фазу, обележавањем антитела флуоресцентним и ензимским обележивачима, припремом коњугата и антисерума за ИНЕП-ове ИИФ и ЕЛИСА тестове.

Посебно значајна стручна усавршавања Марије Љ. Ђатовић односе се на боравке у Европској референтној лабораторији за паразите, Рим, Италија (European reference laboratory for parasites, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy), на тему “Серолошка детекција инфекције са *Trichinella* spp, - развој и валидација дијагностичких тестова” (2013., 2017. год.).

## 2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

### 2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Марије Љ. Гњатовић, дипл. инг., садржи 116 страна (од којих је 101 нумерисано) у оквиру којих се налази 6 поглавља, са укупно 24 слике, 12 табела и 120 литературних навода. Докторска дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Материјал и методе, Циљеви, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском језику. Кандидаткиња је уз текст дисертације приложила и биографију и додатке прописане правилима Универзитета о подношењу докторских теза на одобравање. По својој форми и садржају, поднети рад задовољава све стандарде Универзитета у Београду за докторску дисертацију.

### 2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У Уводу (1. поглавље) су образложени предмет и циљеви истраживања, уз навођење литературног прегледа предметне области. Детаљно су анализирани недостаци у релевантној области истраживања. У уводном делу рада описан је животни циклус паразита као и однос паразит-домаћин. Детаљно су анализирани и антигени паразита *T. Spiralis*, са посебним освртом на састав и улогу екскреторно-секреторног антигена мишићних ларви поменутог паразита. Описана је и улога паразита, односно његових продуката, у покретању и усмеравању имунског одговора домаћина, уз детаљан опис улоге дендритских ћелија као главних антиген-презентујућих ћелија. Анализиран је хуморални имунски одговор на инфекцију *Trichinella*-ом, који се карактерише продукцијом различитих класа специфичних антитела. Даље је дат увид у важност праћења инциденције и преваленције болести изазване паразитом из рода *Trichinella* како код људи тако и код животиња кроз анализу серолошких метода детекције инфекције са *Trichinella spp.*

Циљеви рада изложени су у засебном поглављу (2. поглавље).

Први циљ рада био је да се испита дијагностички потенцијала 7C2C5 mAt кроз развој два ЕЛИСА теста:

- Универзалног компетитивног ЕЛИСА теста намењеног детекцији свих класа *Trichinella*-специфичних антитела код људи и различитих врста животињаживотиња („*Trichinella* c-ELISA“)
- ЕЛИСА теста намењеног детекцији *Trichinella*-специфичних IgE антитела у хуманим серумима („Capture *Trichinella*-IgE ELISA“)

који би допринели квалитетнијој дијагностици инфекције.

Други циљ је био да се изоловањем и применом протеина из састава ES L1 антигена паразита *T. spiralis* идентификованих помоћу 7C2C5 mAt, дефинише улога наведених протеина у покретању и усмеравању имунског одговора на моделу хуманих дендритских ћелија *in vitro*.

У делу дисертације Материјал и методе (3. поглавље) описане су материјал и методе, према редоследу експерименталног истраживачког рада.

Описана је метода за припрему антигена паразита *T. spiralis* који се у даљем раду користи за развој два ЕЛИСА теста, као и за изоловање имунодоминантних компоненти из састава антигена применом моноклонских 7C2C5 антитела. У оквиру овог поглавља детаљно је описана метода за одржавање соја паразита, затим метода за изоловање инфективних мишићних ларви паразита, и коначно метода за добијање екскреторно-секреторних продуката ларви паразита *T. spiralis*.

Даље су описане методе за продукцију моноклонских 7C2C5 у оквиру којих је наведена процедура за гајење хибридне ћелијске линије ATCCNB8678 у *in vitro* условима и њихову апликацију у високо сродне мишеве ради стварања перитонеалног ексудата, а затим и начин изоловања моноклонског антитела применом технике таложења амонијум-сулфатом (делимично пречишћавање). Са циљем да се моноклонска 7C2C5 антитела користе као детектујућа антитела у компетитивном формату ЕЛИСА теста, вршено је коњуговање ових антитела са пероксидазом рена (HRP) применом NaIO<sub>4</sub> технике.

Како би се постигао други циљ докторске дисертације, а који се односи на испитивање улоге протеина идентификованих помоћу 7C2C5 антитела (тзв. 7C2C5 антигена) у покретању и усмеравању имунског одговора на моделу хуманих дендритских ћелија (Дћ), вршено је изоловање и карактеризација протеина препознатих од стране 7C2C5 мАт применом афинитивне хроматографије. Припрема матрикса (Sepharose 4B) за имобилизацију лиганда (7C2C5 мАт) вршена је употребом CNBr-методе. Тестирање изолованих фракција вршено је применом 1D електрофорезе, Western blot технике и течне хроматографије високих перформанси (HPLC) помоћу аналитичке C-18 колоне.

У истом поглављу су дате си и детаљне смернице за развој и валидацију квалитативних и семиквантитативних ЕЛИСА тестова. Прва фаза развоја тестова подразумева поступак оптимизације и стандардизације тестова, док се друга фаза односи на валидацију тестова за чије извођење је дата детаљна процедура.

Резултати истраживања приказани су у 4. поглављу. Имунореактивност 7C2C5 антитела према ES L1 Аг *T. spiralis* испитана је применом Western blot технике. Тестом инхибиције установљено је да се 7C2C5 мАт антитела везују за исти епитоп на антигену као и серумска специфична антитела настала као одговор на инфекцију изазвану паразитом *T. spiralis*, односно, да су специфична према имунодоминантном епитопу, чиме је потврђена могућност њихове примене у епитоп блокирајућим моделима серолошких тестова. Тестом инхибиције, по први пут до сада, показано је да је исти епитоп одговоран за покретање имунског одговора и у случају инфекције са *T. britovi*. Дат је приказ кинетике реакције везивања антитела, потенцијалних учесника у конкуренцији, за антиген, како би се коначно дефинисала могућност примене 7C2C5 антитела у компетитивном или другим врстама епитоп-блокирајућих тестова. Мултифакторијалном титрацијом дефинисани су оптимални услови за извођење компетитивног ЕЛИСА теста. Контрола квалитета тако дефинисаног теста испитана је анализом дозне зависности на примеру једног високо позитивног узорка серума. Дефинисана је и листа фактора који могу утицати на резултате ЕЛИСА теста, са детаљним прегледом опсега у којима резултати теста остају непромењени (робусност теста), што је од пресудног значаја за примену у пракси. Са циљем да се развије универзални тест намењен детекцији специфичних антитела у различитим врстама домаћина, дефинисане су cut-off вредности за сваку појединачну врсту домаћина, како би се доказало да је могуће усвојити јединствену cut-off вредност. Дефинисан је и ниво аналитичке и дијагностичке специфичности и сензитивности. Евалуација овде приказаног компетитивног ЕЛИСА теста за примену у различитим фазама инфекције паразитом, урађена је анализом серума сакупљених у различитим фазама инфекције експериментално инфицираних свиња и коња. Исти поступак оптимизације и стандардизације услова извођења теста, као и валидације (тзв. предвалидације) урађен је за све тестове приказане у раду а који се односе на детекцију *Trichinella*-специфичних IgE антитела.

Моноклонско 7C2C5 антитело, које препознаје имунодоминантни епитоп специфичан за мишићне ларве рода *Trichinella*, коришћено је за изолацију

гликопротеина који носе имунодоминантни епитоп одговоран за покретање хуморалног имунског одговора, применом афинитивне хроматографије. Приказани су резултати квалитативне анализе добијеног изолата урађене применом HPLC хроматографије, SDS PAGE електрофорезе и Western blot технике на којима се виде јасно уочљиве три протеинске фракције (45, 49 и 53 kDa). Након стимулације хуманих ДТ применом изолата, тзв, 7C2C5 Аг, одређене су фенотипске карактеристике тако стимулираних ћелија, анализом релевантних површинских маркера експримираних на ћелијама. Дат је приказ репрезентативних плотова добијених FACS анализом, као и приказ процената експресије површинских маркера стимулираних ДТ у односу на нестимулисане ћелије. Функционална карактеризација хуманих ДТ, стимулираних антигенима *T. spiralis* у *in vitro* условима праћена је одређивањем концентрације цитокина у супернатантима ћелијских култура. Дат је приказ нивоа цитокина IL-10, TGF- $\beta$ , IL-12p70 за све врсте коришћених стимулуса као и контролне групе ДТ.

У поглављу број 5, дискутовани су добијени резултати у складу са литературним подацима релевантним за област.

У поглављу број 6, таксативно су приказани најважнији закључци, изведени на основу испитивања изложених у претходним поглављима. Након поглавља број 6, наведене су референце коришћене током израде докторске дисертације.

### 3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

#### 3.1. Савременост и оригиналност

На пољу иминопаразитологије, праћење инциденције и преваленције инфекције изазване паразитом из рода *Trichinella* како код људи тако и код животиња базира се, поред осталог, на примени *in vitro* дијагностичких тестова који детектују специфична антитела у серуму инфицираног домаћина. Овакво праћење је од изузетног значаја због чињенице да поменута паразитоза представља озбиљан здравствени и економски проблем широм света, а нарочито у земљама централне и источне Европе. Данас се у дијагностици инфекције са *Trichinella* spp. најшире примењују ЕЛИСА тестови различитих формата. Континуирани развој серолошких тестова за детекцију инфекције овим паразитом у великој мери је допринео бољем разумевању преваленце и епидемиологије наведене зоонозе. Квалитет тестова утиче на успешност у постављању дијагнозе, а самим тим и на брзину одређивања адекватне терапије болести код људи. Упркос напретку у развоју серолошких тестова дијагноза трихинелозе и даље представља изазов.

Прегледом актуелне научне литературе установљено је да се кључни проблеми који се у имунодијагностици инфекције јављају, како у хуманој тако и ветеринарској медицини, управо односе на квалитет примењених тестова. Недостаци постојећих тестова јесу висок ниво неспецифичности, затим низак ниво сензитивности у почетним фазама инфекције, али и непостојање универзалних тестова намењених детекцији инфекције код различитих врста домаћина што је од посебне важности за праћење стања ове зоонозе код животиња.

Зато је први циљ овог рада био испитивање могућности примене 7C2C5 моноклонског антитела (која препознају епитоп карактеристичан за мишићне ларве рода *Trichinella*, присутан на триплету протеина од 45, 49, 53 kDa), у формирању ЕЛИСА теста веће сензитивности и специфичности у односу на све постојеће. Велики дијагностички потенцијал 7C2C5 мАт добио је потврду у формирању иновативног, компетитивног ЕЛИСА теста – „*Trichinella* c-ELISA“, намењеног откривању свих класа *Trichinella*-специфичних антитела код људи и домаћих свиња, са потенцијалом да тест

буде примењен и код других врста животиња суспектних на инфекцију изазвану наведеним паразитом.

Детекција *Trichinella*-специфичних IgG антитела у хуманим серумима представља доказ постојања инфекције, али не указује на чињеницу када је та инфекција настала, тј. указује на то да је пацијент у једном периоду свог живота био инфициран овим паразитом. Хроничну фазу инфекције није могуће разликовати од акутне фазе инфекције само на основу присуства IgG специфичних антитела. Познато је да је код значајног броја инфицираних људи клиничка слика у акутној фази инфекције блага или чак потпуно изостаје. За успостављање адекватне дијагнозе, праћење тока болести и прогнозу болести од великог је значаја дефинисање фазе инфекције у којој се пацијент налази. Истраживање маркера акутне фазе инфекције, односно маркера који би разликовали акутну од хроничне фазе, као и испитивање антигена који би се у ЕЛИСА тестовима користили за рано откривање инфекције обухваћени су великим бројем истраживања, али до значајнијих помака на пољу имунодијагностике ране фазе инфекције није дошло.

Анализа једног од потенцијалних маркера акутне фазе инфекције хумане трихинелозе – *Trichinella*-специфичних IgE антитела, била би омогућена развојем поузданог теста за откривање специфичних IgE антитела у хуманим серумима, с обзиром на то да такви тестови нису комерцијално доступни, док је сензитивност тестова развијених за потребе научног рада на незадовољавајућем нивоу (35 -75%). Детекција паразит-специфичних IgE антитела у великој мери је отежана чињеницом да је концентracија ових антитела у серумима пацијената занемарљива у односу на друге класе паразит-специфичних антитела. У класичном индиректном ЕЛИСА тесту долази до блокирања везујућих места на антигену везаном за чврсту фазу од стране концентрацијски доминантнијих класа антитела, што у потпуности онемогућава поуздано откривање IgE класе специфичних антитела. Уклањање IgG антитела из узорака серума применом различитих врста абсорбената, уз примену класичног или појачаног индиректног ЕЛИСА теста намењеног детекцији паразит-специфичних IgE антитела у тако третираним серумима, представља један од најчешће кориштених приступа решењу проблема конкуренције описаних у литератури. У раду је дат потпуно нов приступ у детекцији паразита специфичних IgE антитела – „Capture *Trichinella*-IgE ELISA” тест. Базиран је на примени два пара моноклонских антитела, анти-хуманог IgE антитела и 7C2C5 анти-*Trichinella* моноклонског антитела. Добијени резултати указују на велику поузданост теста у детекцији *Trichinella* специфичних IgE антитела у хуманим серумима.

Добро је познато да паразитски антигени модулишу имунски одговор преко Дћ, индукујући Th2 и регулаторни одговор док у исто време инхибирају Th1 и Th17 одговор, а неки од испитиваних антигена паразита показују капацитет да индукују толерогени Дћ фенотип. Толерогене Дћ имају фенотип незрелих или полузрелих ћелија, имају ниску продукцију про-инфламаторних цитокина (IL-12), и повећану продукцију анти-инфламаторних цитокина (TGF-beta, IL-10), и поседују капацитет да индукују Т ћелије регулаторног типа (Treg). Толерогене Дћ добијене третирањем ES L1 антигеном, примењене у анималном моделу мултипле склерозе, довеле су до ублажавања тока експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ), што указује на потенцијал ових ћелија у терапији инфламаторних поремећаја као што су аутоимунске болести. Међутим, још увек нису идентификоване компоненте из комплексне смеше ES L1 Аг које поседују имуномодулаторна својства. У овом истраживању пошло се од претпоставке, начињене на основу досадашњих резултата добијених применом 7C2C5 Аг у анималном моделу, да су ови протеини, препознати од стране 7C2C5 мАт, за које је показано да су носиоци имунодоминантног епитопа који

индукује синтезу специфичних антитела током читавог тока инфекције, одговорни за поларизацију имунског одговора која се добија применом укупног антигена ES L1. Постављени циљ био је да се ова претпоставка испита у *in vitro* условима на ћелијама хуманог порекла. Значај овде приказаних истраживања је у томе што је по први пут показано какав је утицај појединачних компоненти продукта хелминтских антигена на хумане дендритске ћелије. Дефинисање појединачних компоненти из састава ES L1 Ag (7C2C5 Ag) које поседују имуномодулаторна својства представа корак даље у креирању терапије намењене лечењу инфламаторних болести.

На основу опсежног прегледа литературе, може се закључити да се истраживања у оквиру ове докторске дисертације уклапају у светске трендове и указују на значај и актуелност проучаване проблематике.

### 3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације кандидата Марија Љ. Ђатовић, цитирано је 120 литературна навода који су омогућили да се прикаже стање у испитиваној области, као и актуелност проблематике. Највећи број цитираних радова чине радови из међународних часописа са тематиком значајном за израду докторске дисертације. Савремена истраживања објављена у наведеним научним радовима су описана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су омогућили добар увид у потенцијал за примену моноклонског 7C2C5 антитела како за развој нових дијагностичких тестова намењених детекцији инфекције са *Trichinella spp.* тако и за изолацију имунодоминантног антигена *Trichinella spiralis*, чија структурна и функционална карактеризација би допринела креирању нових терапеутских приступа у третману аутоимунских и алергијских обољења, као и приликом трансплантација. На основу пажљиве анализе резултата приказаних у научној литератури изложене су основне смернице за истраживања која су извршена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из наведене литературе која је коришћена у истраживању, уочава се изузетно велико познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

### 3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати у оквиру ове дисертације доказани су одговарајућим експериментима, као и савременим инструменталним мерењима према оригиналним или модификованим методама из литературе.

Поступак добијања ES L1 антигена, коме претходи одржавање соја паразита и изолација мишићних ларви паразита, високо је стандардизован и у складу са инструкцијама датим од стране Европске референтне лабораторије за паразите о поступку производње антигена. За производњу моноклонског 7C2C5 антитела коришћена је хибридна ћелијска линија АТССНВ8678. Након умножавања ћелија у ћелијској култури, вршена је њихова апликација у високосродне мишеве (Balb/cj) ради добијања перитонеалног ексудата у коме се антитела налазе у већој количини. Квалитет добијеног ексудата провераван је у директном ЕЛИСА тесту, док је концентрација протеина одређивана применом спектрофотомтријске методе. Изолација моноклонског антитела вршена је применом технике таложења амонијум сулфатом (делимично пречишћавање) и гел филтрације. Изоловање имунодоминантних протеинских фракција из састава ES L1 Ag, рађено је применом афинитивне хроматографије уз коришћење 7C2C5 моноклонског антитела које специфично препознаје имунодоминантне епитопе..



Активација матрикса (Sephacrose 4B) и везивање 7C2C5 моноклонског антитела вршено је применом CNBr-методе. Тестирање изолованих фракција рађено је применом 1D електрофорезе, Western blot технике и течне хроматографије високих перформанси (HPLC) помоћу аналитичке C-18 колоне.

Поступак оптимизације, стандардизације услова извођења као и валидације свих ЕЛИСА тестова обухваћених радом, урађен је према смерницама датим од стране Светске здравствене организација (WHO) и Светске организације за здравље животиња (OIE), а које су детаљно описане у делу материјал и методе.

С обзиром да су дендритске ћелије најпотентније антиген презентујуће ћелије у организму домаћина, коришћене су као модел систем за *in vitro* испитивање улоге ES L1 Ag и 7C2C5 Ag у покретању имунског одговора. Пре свега је вршено изоловање моноклеарних ћелија периферне крви из крви добровољних даваоца, сепарацијом на градијенту, затим *in vitro* култивација хуманих Дћ из моноцита и стимулација добијених Дћ антигенима: ES L1, 7C2C5 Ag, LPS (ендотоксин-липополисахарид). Одређивање фенотипских карактеристика Дћ вршено је применом проточне цитофлуориметрије мерењем експресије површинских молекула коришћењем следећих моноклонских антитела: анти-HLDR, анти-CD40, анти-CD83 и анти-CD86. Одређивање функционалних карактеристика Дћ вршено је мерењем нивоа цитокина (IL-10, IL-12p70, TGF β) у културама Дћ након култивације са антигенима, применом комерцијалних ЕЛИСА тестова.

#### 3.4. Применљивост остварених резултата

Иновативни компетитивни ЕЛИСА тест, базиран на примени 7C2C5 моноклонског антитела, намењен је детекцији инфекције са различитим врстама *Trichinella*, како код људи тако и код различитих врста животиња. Применљивост теста доказана је на серумима људи инфицираних са *T. spiralis* и *T. britovi*, серумима природно и експериментално инфицираних свиња са *T. spiralis* и *T. pseudospiralis* и серумима експериментално инфицираних коња (*T. spiralis*). Применљивост теста показана је и на лимитираном броју узорака експериментално инфицираних дивљих свиња (узрочник инфекције била је *T. spiralis*). „*Trichinella* c-ELISA“ тест једини је тест са оваквом наменом валидиран на статистички задовољавајућем броју узорака серума различитих врста домаћина, те се може сматрати универзалним, односно могуће је применити га у детекцији инфекције људи или животиња коришћењем потпуно истих компоненти теста, протокола и постављених дијагностичких параметара теста. Иновативни „*Trichinella* c-ELISA“ тест показује 100% специфичности и сензитивности, што је потврђено и применом Western blot технике. Тест је једноставан за коришћење а са укупним временом од 45 мин. потребним за извођење теста, представља најбржи формат ЕЛИСА теста приказан у литератури. Употребом оваквог теста у пракси смањено би се један од највећих ризика коришћења постојећих ЕЛИСА 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.

За успостављање адекватне дијагнозе, праћење тока болести и прогнозу болести од великог је значаја дефинисање фазе инфекције у којој се пацијент налази. Испитивање једног од потенцијалних маркера акутне фазе инфекције, односно маркера који би разликовали акутну од хроничне фазе инфекције омогућено је применом „Capture *Trichinella*-IgE ELISA“ теста намењеног детекцији *Trichinella*-специфичних IgE антитела у хуманим серумима. Наведени тест омогућава поуздано праћење концентрације специфичних IgE антитела у серумима пацијената оболелих од

трихинелозе, будући да је ово тест значајно повећене сензитивности и специфичности у односу на тестове приказане у литератури а имајући у виду и да такви тестови комерцијално нису доступни. Подаци добијени на тај начин омогућили би боље сагледавање дијагностичког значаја овог параметра за који се сматра да може бити маркер ране фазе инфекције. Такође, постојање поузданог теста омогућава истраживања усмерена и ка испитивању потенцијалне протективне улоге специфичних IgE антитела, анализом корелација између концентрације присутних IgE антитела и тежине клиничке слике пацијената. Овај феномен раније је уочен на анималним моделима. „Capture“ модел ELISA теста приказан у оквиру ове докторске дисертације, уз мање модификације може бити прилагођен за примену у детекцији *Trichinella*-специфичних IgE антитела код других врста домаћина, па чак у детекцији специфичних IgE антитела насталих као одговор на друге врсте паразита.

Значај испитивања улоге 7C2C5 антигена у покретању имунског одговора *in vitro* лежи у дефинисању компоненти ES L1 антигена које су кључне за покретање и усмеравање имунског одговора преко Дћ, а које имају потенцијалну имуномодулаторну функцију, како би се та сазнања могла искористити за креирање нових терапеутских приступа у лечењу инфламаторних поремећаја.

### 3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Спроведећи иновативна истраживања током израде докторске дисертације, кандидат Марије Љ. Гњатовић, испољила је изузетну стручност у реализацији експеримената кроз модификацију и оптимизацију примењених техника и метода, као и кроз анализу и начин приказивања резултата. Током својих истраживања, спроведених врло одговорно и зрело, испољила је како самосталност у раду, систематичност и креативност, тако и критичност. Током докторских студија, кандидат се истицао способношћу да на прави начин представи и у потпуности објасни све аспекте бројних експерименталних резултата до којих је долазила како у самосталном тако и у тимском раду. На основу постигнутих резултата и изузетног залагања, те доприноса развоју науке, Комисија је мишљења да кандидат Марија Љ. Гњатовић, дипл. инг. поседује све неопходне квалитете за самостални научно-истраживачки рад.

## **4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС**

### 4.1. Приказ остварених научних доприноса

Резултати до којих се дошло у оквиру ове дисертације дају значајан научни допринос у области имунологије и имунопаразитологије.

- Специфичан научни допринос остварен је развојем и валидацијом иновативног компетитивног ЕЛИСА теста намењеног детекцији *Trichinella*-специфичних антитела у серумима различитих врста домаћина, базираног на примени моноклонског 7C2C5 антитела, повећане сензитивности и значајно повећане специфичности у односу на све постојеће ЕЛИСА тестове који имају исту намену.
- Кроз анализу карактеристика моноклонског антитела кључних за примену у компетитивном ЕЛИСА формату, развој компетитивног ЕЛИСА теста и анализу свих параметра који могу утицати на процес конкуренције, у потпуности је сагледан овај феномен, што омогућава даље коришћење стечених знања у сврху развоја и производње нових имунодијагностичких тестова базираних на компетитивној реакцији.

- Значајан научни допринос остварен је развојем тзв. „Capture *Trichinella*-IgE ELISA“ теста намењеног детекцији *Trichinella*-специфичних IgE антитела у серумима пацијената оболелих од трихинелозе, базираног на примени два пара моноклонских антитела – анти-хуманих IgE и 7C2C5 антитела, с обзиром да овакви тестови комерцијално нису доступни док је сензитивност тестова приказаних у литератури на незадовољавајућем нивоу.
- Кроз развој „Capture *Trichinella*-IgE ELISA“ теста приказан је потпуно нови приступ решењу проблема конкуренције који се у пракси често јавља у случају детекције концентрацијски мање заступљенијих класа специфичних антитела применом индиректног ЕЛИСА формата. Уз мање модификације оваква врста теста може бити прилагођена за примену у детекцији специфичних IgE антитела насталих као одговор на друге врсте паразита као и код других врста домаћина.
- Примена 7C2C5 моноклонског антитела омогућила је остваривање важног циља ове тезе, а то је изолација и карактеризација имунокомпетентних протеина које ова антитела препознају - тзв. 7C2C5 Аг, а у циљу дефинисања улоге наведених протеина у покретању и усмеравању имунског одговора на моделу хуманих дендритских ћелија *in-vitro*. Значајан научни допринос остварен је тиме што је у раду по први пут показано да имунодоминантне компоненте ES L1 Аг, означене као 7C2C5 Аг, поседују потенцијал за генерисање хуманих толерогених ДЋ *in vitro*, с обзиром да се данас сматра да управо толерогене ДЋ представљају потенцијалну ћелијску терапију применљиву у третману аутоимунских и алергијских болести, као и приликом трансплатација.

#### 4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Истраживања која су изведена у овој докторској дисертацији конципирана су на основу претходно дефинисаних циљева и детаљне анализе литературе из области имунодијагностике и имуномодулације.

Имуноблот анализом серума људи и животиња инфицираних паразитом из рода *Trichinella*, утврђено је од стране већег броја аутора да, без обзира на порекло, сви серуми реагују са три протеинске траке из састава ES L1 Аг (45, 49 и 53 kDa), што указује да ови протеини носе имунодоминантни епитоп који покреће стварање специфичних антитела. Исти епитоп на поменутиим протеинским тракама препознаје и моноклонско антитело 7C2C5 (mAb) те је оно у овом раду коришћено како за развој два иновативна ЕЛИСА теста, тако и за изолацију три наведене протеинске фракције (тзв. 7C2C5 антиген), а које су се даље користиле за испитивање потенцијала да покрену имунски одговор који одговара профилима одговора активираним са укупним ES L1 антигеном.

Велики дијагностички потенцијал 7C2C5 антитела добио је потврду у формирању конкуритивног *Trichinella* ЕЛИСА теста, повећане сензитивности и специфичности у односу на све постојеће ЕЛИСА тестове. Поменути тест представља иновативно решење конкуритивног ЕЛИСА теста базираног на примени 7C2C5 антитела, развијеног од стране др R. Gamble и сарадника (1984), које се огледа у смањењу броја инкубација и значајном скраћењу времена потребном за извођење теста. Такође, поменути тест развијен је и валидиран за потребе детекције инфекције свиња без анализе серума других врста домаћина. Са циљем да се развије универзални ЕЛИСА тест, валидација „*Trichinella* c-EELISA“ теста, урађена је на статистички

задовољавајућем броју узорака (укупно 445) пореклом од различитих врста домаћина (људи, свиње, коњи) док су за испитивање применљивости теста у различитим фазама инфекције коришћени додатни серуми, пореклом од експериментално инфицираних животиња. Ово је други тест по реду валидиран на статистички задовољавајућем броју узорака намењен детекцији *Trichinella*-инфекције код људи до сада, и први који је валидиран за примену код различитих врста потенцијалних домаћина (људи, свиње, коњи). Уз додатна испитивања која би обухватила и већи број серума дивљачи, пре свега дивљих свиња, тест би се сматрао универзалним за примену код различитих врста домаћина применом истих компоненти и дефинисаних параметара теста.

У раду је такође показано да тзв. појачани индиректни ЕЛИСА тест, као један од најчешће коришћених приступа у детекцији паразит-специфичних IgE антитела, а који је базиран на примени две врсте детектујућих антитела са циљем да се изврши амплификација сигнала, показује низак ниво сензитивности у детекцији *Trichinella*-специфичних IgE антитела у хуманим серумима. Измерене вредности OD добијене у индиректном ЕЛИСА тесту биле су ниске (у опсегу од 0,110 до 0,450), без обзира на коришћење принципа амплификације сигнала, вероватно као последица инхибиције везивања специфичних IgE антитела од стране IgG класе антитела. Из истог разлога јавља се и велики број лажно негативних резултата у тесту (37,5%). Показано је и да други најчешће коришћени начин детекције паразит-специфичних IgE антитела приказан у литератури, који подразумева употребу узорака серума третираних различитих врста IgG абсорбената, у сврху уклањања укупних IgG антитела из узорака серума, за детекцију у појачаном индиректном ЕЛИСА формату, такође не омогућава поуздану детекцију *Trichinella*-специфичних IgE антитела. Иако је сензитивност теста значајно повећана употребом третираних серума, и то са 67,5% на 97,5%, јавља се проблем ниске репродукцибилности теста те се овакав приступ не препоручује за ширу примену. Коначно, постављени циљ докторске дисертације остварен је развојем „Capture *Trichinella*-IgE ELISA“ теста намењеног откривању специфичних антитела IgE класе против *Trichinella spp* у хуманим серумима. Оптимизација и стандардизација услова извођења теста урађена је коришћењем референтних серума Националне референтне лабораторије за трихинелозу, док је поступак предвалидације урађен на 40 серума пацијената оболелих од трихинелозе. На основу ROC анализе постигнуте су значајно веће вредности дијагностичке сензитивност и специфичност теста (од 97,6% и 97,5%, респективно) у односу на све до сада у литератури приказане резултате. Ниједан од серума коришћених за дефинисање аналитичке специфичности теста није дао лажно позитиван резултат у тесту (аналитичка специфичност теста износила је 100%). На основу анализе добијених резултата, може се закључити да је потенцијал за примену „Capture *Trichinella*-IgE ELISA“ теста велики, али да је неопходно претходно урадири валидацију теста на статистички задовољавајућем броју узорака пацијената оболелих од трихинелозе.

С обзиром да су дендритске ћелије најпотентније антиген-предентујуће ћелије у организму домаћина, коришћене су као модел систем за *in vitro* испитивање улоге ES L1 Ag и 7C2C5Ag у покретању имунског одговора. Стимулација DC изолованих из периферне крви како са ES L1 Ag *T. spiralis* тако и са 7C2C5Ag, резултира делимичним сазревањем Дћ. Анализом функционалних карактеристика овако третираних Дћ, добијени су јасни анти-инфламаторни цитокински профили у оба случаја, а које карактерише низак ниво продукције IL-12 заједно са повећаном продукцијом анти-инфламаторног/регулаторног цитокина IL-10. Резултати су показали да степен експресије површинских маркера под утицајем 7C2C5Ag одговара степену експресије наведених маркера на Дћ стимулираних укупним ES L1 Ag *T. spiralis*. Анализирањем цитокинског профила уочено је да Дћ стимулисане са 7C2C5 Ag продукују исти ново

цитокина IL-10 и IL-12p70 али не и цитокина TGF- $\beta$  као и ДЋ третиране ES L1 Аг. На основу приказаних резултата може се закључити да 7C2C5 Аг значајно учествује у укупном ефекту који ES L1 Аг производи на ДЋ. Значај овде приказаних истраживања је у томе што је у овом раду по први пут показано какав је утицај појединачних компоненти продуката хелминтских антигена на хумане дендритске ћелије.

Увидом у доступну литературу и поређењем са оствареним резултатима добијеним применом адекватних савремених метода истраживања и анализе није тешко констатовати да су резултати дисертације значајни не само са научног, већ и са практичног аспекта.

#### 4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Марија Љ. Гњатовић је резултате свог истраживања током израде ове дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштавањем радова на међународним скуповима. Резултати досадашњег научно-истраживачког рада кандидата у овој области приказани су у 4 (четири) рада објављена у научним часописима међународног значаја (ознака групе M20: врста резултата M21 - 2 рада, врста резултата M22 - 1 рад, врста резултата M23- 1 рад).

#### Списак радова који су резултат истраживања у оквиру докторске дисертације

##### Категорија M21:

1. Gnjatovic, M., Gruden-Movsesijan, A., Miladinovic-Tasic, N., Ilic, N., Vasilev, S., Cvetkovic, J., Sofronic-Milosavljevic, Lj.: A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of antibodies against *Trichinella spiralis* and *T. britovi* – one test for humans and swine, *Journal of Helminthology*, 23:1–9, 2017, IF(2015)=1.420 (ISSN 0022-149X)
2. Cvetkovic, J., Sofronic-Milosavljevic, Lj., Ilic, N., Gnjatovic, M., Nagano, I., Gruden-Movsesijan, A.: Immunomodulatory potential of particular *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components, *International Journal for Parasitology*, 46(13-14), 833-842, 2016, IF(2015)=4.242 (ISSN 0020-7519).

##### Категорија 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*, 61, 312-325, 2015, IF(2015)=3.330 (ISSN 0257-277X)

##### Категорија M23:

1. 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*, 79, 1477-1490, 2014, IF(2014)=1.009 (ISSN 0352-5139)

## 5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега наведеног Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Марија Љ. Гњатовић (рођ. Девих), под насловом „Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита које носе имунодоминантни епитоп“ представља значајан и оригиналан научни допринос у датој области, што је и потврђено кроз објављивање радова у часописима међународног значаја. Предмет и циљеви који су постављени су јасно наведени и у потпуности остварени. Комисија је мишљења да докторска дисертација под називом „Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита које носе имунодоминантни епитоп“ у потпуности испуњава све захтеване критеријуме као и да је кандидат током израде дисертације показао изузетну научно истраживачку способност у свим фазама израде ове дисертације.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, да прихвати овај Реферат, пружи на увид јавности поднету докторску дисертацију кандидата Марије Љ. Гњатовић (рођ. Девих), дипл. инг. у законом предвиђеном року, као и да Реферат упути Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду и да након завршетка процедуре позове кандидата на усмену одбрану дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

---

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

---

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

---

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

---

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

У Београду, 10.09.2018. године