

**Наставно-научном већу  
Хемијског факултета  
Универзитета у Београду**

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета одржаној 11. јула 2019. године одређени смо у Комисију за писање извештаја о оцени испуњености услова и оправданости предложене теме докторске дисертације Радмиле Д. Миљковић, мастер биолога, под називом: „Профилактичко дејство рекомбинантне изоформе лектина банане у запаљенским болестима црева: испитивање на моделу хемијски индукованог колитиса у миша“. На основу поднете и прикупљене документације подносимо Наставно-научном већу Хемијског факултета следећи извештај.

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **А. Биографски подаци**

#### **Општи подаци**

Име, средње слово и презиме: **Радмила Д Миљковић** (рођена **Ђокић**)  
Датум и место рођења: **17.11.1990. Београд**  
Адреса: **Самјуела Бекета 24**  
Телефон: **+381637083679**  
E-mail: [\*\*milladjbio@gmail.com\*\*](mailto:milladjbio@gmail.com)

#### **Образовање**

- 2016- Докторске студије, смер Биохемија, Хемијски факултет, Универзитет у Београду
- 2014-2015. Мастер биолог, модул Молекуларна биологија и физиологија, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
- 2009-2014. Дипломирани биолог, модул Молекуларна биологија и физиологија Биолошки факултет, Универзитет у Београду

#### **Радно искуство**

- 2014-2018. Волонтер, Институт за вирусологију, вакцине и серуме ”Торлак”
- 2018- Истраживач приправник, Институт за вирусологију, вакцине и серуме ”Торлак”

#### **Стручна усавршавања**

- 2017. Стручно усавршавање у трајању од 2 месеца у лабораторији The Laura Bassi Centre of Expertise, Institute of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine, The Centre for Pathophysiology, Infectology and Immunology, Medical University, Vienna, Austria. Усавршавање је реализовано под покровитељством Европске федерације биохемијских друштава (енгл. Federation of European Biochemical Societies) која је Радмили Миљковић доделила стипендију **FEBS Collaborative Experimental Scholarship**
- 2015. “7<sup>th</sup> **EFIS/EJI South-East European Immunology school**”: школа имунологије у организацији EFIS (енгл. European Federation of Immunological Societies), Бечићи, Црна Гора.

## Учешће на пројектима

1. Од 2014. године учествује у истраживањима која се реализују у оквиру пројекта:

“Алергени, антитела, ензими и мали физиолошки значајни молекули: дизајн, структура, функција и значај” (руководилац пројекта проф. др Марија Гавровић-Јанкуловић, Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, прој. бр. 172049)

2. Од 2014-2018. године учествовала у истраживањима реализованим у оквиру пројекта:

*OCUVAC: Ocular Chlamydia trachomatis vaccine development* (Министарство економије Аустрије, FFG пројекат бр. 822768; носилац пројекта *The Laura Bassi Centre of Expertise, Institute of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine, The Centre for Pathophysiology, Infectology and Immunology, Medical University, Vienna, Austria*)

3. Од 2019. учесник је COST акције CA18132 под називом "GLYCONanoPROBES- Functional Glyconanomaterials for the Development of Diagnostics and Targeted Therapeutic Probes"

## Чланство у научним друштвима:

Биохемијско друштво Србије

## Б. Објављени научни радови и саопштења

Радмила Д. Миљковић је публиковала четири рада у врхунским међународним часописима (M21). На скуповима од међународног значаја учествовала је са 11 саопштења, док је на скуповима од националног значаја учествовала са 4 саопштења.

### 1. Радови објављени у врхунским међународним часописима (категорија M21)

1. Lukić I, Filipović A, Inić-Kanada A, Marinković E, **Miljković R**, Stojanović M (2018) Cooperative binding of anti-tetanus toxin monoclonal antibodies: Implications for designing an efficient bivalent preparation to prevent tetanus toxin intoxication. *Vaccine*. 36(26):3764-3771 doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.058
2. Marinković E, **Đokić R**, Lukić I, Filipović A, Inić-Kanada A, Kosanović D, Gavrović-Jankulović M, Stojanović M (2017) Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. *PLoS ONE*. 12(2): e0172469 doi: 10.1371/journal.pone.0172469
3. Filipović A, Ghasemian E, Inić-Kanada A, Lukić I, Stein E, Marinković E, **Djokić R**, Kosanović D, Schuerer N, Chalabi H, Belij-Rammerstorfer S, Stojanović M, Barisani-Asenbauer T. (2017) The effect of infectious dose on humoral and cellular immune responses in *Chlamydomonas caviae* primary ocular infection. *PLoS ONE*. 12 (7): e0180551 doi: 10.1371/journal.pone.0180551
4. Inić-Kanada A, Stojanović M, Marinković E, Becker E, Stein E, Lukić I, **Đokić R**, Schuerer N, Hegemann H J, Barisani-Asenbauer T. (2016) A Probiotic Adjuvant *Lactobacillus rhamnosus* Enhances Specific Immune Responses after Ocular Mucosal Immunization with Chlamydial Polymorphic Membrane Protein C. *PLoS ONE*. 11(9): e0157875. doi:10.1371/journal.pone.0157875

**2. Саопштења на скуповима међународног значаја, штампана као изводи одговарајућег међународног часописа или у зборнику сажетка (M34)**

1. Inić-Kanada A, Stojanović M, Stein E, Lukić I, Ghasemian E, Filipović A, **Miljković R**, Barisani-Asenbauer T. Corpuscular carrier enhances immune response after conjunctival immunization with chlamydial outer membrane proteins. 5<sup>th</sup> European Congress of Immunology-ECI 2018, Abstract book p458-458, Amsterdam, Holandija, 2-5. Septembar 2018.
2. Stojanović M, **Miljković R**, Filipović A, Lukić I, Inić-Kanada A, Gavrović-Jankulović M, Marinković E. Prophylactic treatment with recombinant banana lectin reduce severity of TNBS-induced colitis in BALB-c mice, 5<sup>th</sup> European Congress of Immunology-ECI 2018, Abstract book, p. 186-186, Amsterdam, Holandija, 2-5. Septembar 2018.
3. Inić-Kanada A, Lukić I, Stojanović M, Stein E, Marinković E, Filipović A, **Djokić R**, Kosanović D, Schuerer N, Ghasemian E, Barisani-Asenbauer T. Anti-tetanus antibodies confer modest heterologous protection against ocular chlamydial infection. OGAI 2017-Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology, Book of Abstracts p43, abstract no. P06.15, Vienna, Austria, 23-25. Novembar 2017.
4. Lukic I, Inic-Kanada A, Stein E, Marinkovic E, Filipovic A, **Đokić R**, Barisani-Asenbauer T, Stojanovic M. The role of heterologous immunity in resistance to ocular chlamydial infection, VII conference Serbian Biochemical Society, pp. 152-153, Beograd, Srbija, 10. Novembar 2017.
5. E. Marinkovic, **R. Đokić**, A. Filipović, I. Lukić, D. Kosanović, A. Inić-Kanada, M. Gavrović-Jankulović, M. Stojanović. The Effects of Prophylactic Treatment of Recombinant Banana on TNBS- Induced Colitis in BALB/c Mice. VII Conference of Serbian Chemical Society, pp. 157- 158, Beograd, Srbija, 10. Novembar 2017.
6. Marinkovic Emilija, **Djokic Radmila**, Filipovic Ana, Lukic Ivana, Kosanovic Dejana, Inic-Kanada Aleksandra, Gavrovic-Jankulovic Marija, Stojanovic Marijana. Prophylactic effect of recombinant banana lectin on TNBS-induced colitis in BALB/c mice. 42<sup>nd</sup> FEBS Congress-From Molecules to Cells and Back, Jerusalem, Israel, 10-14 Septembar 2017.
7. A. Inić- Kanada, I. Lukić, M. Stojanović, E. Stein, E. Marinković, A. Filipović, **R. Đokić**, D. Kosanović, N. Schuerer, E. Ghasemian, T. Barisani-Asenbauer. Tetanus vaccination related to the decline of trachoma in the Western World? Anti- tetanus antibodies confer partial protection against ocular chlamydial infection. Investigative Ophthalmology & Visual Science; ARVO Annual Meeting, vol. 58, no. 8, Baltimore, USA, 7-11. May, 2017.
8. A. Inić-Kanada, A. Filipović, E. Ghasemian, I. Lukić, E. Stein, E. Marinković, **R. Đokić**, N. Schuerer, M. Stojanović, T. Barisani-Asenbauer. The effect of infectious dose on specific IgA and cellular immune responses in *C. caviae* primary ocular infection. 15<sup>th</sup> German Chlamydial Workshop, Jena, Germany, 22-24 Februar 2017.
9. Inić-Kanada Aleksandra, Stojanović Marijana, Marinković Emilija, Stein Elisabeth, Lukić Ivana, Belij Sandra, Schuerer Nadine, Montanaro Jacqueline, Ghasemian Ehsan, **Djokić Radmila**, Barisani-Asenbauer Talin. Immune Responses Induced by chlamydial Polymorphic Membrane Protein C formulated with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* as an Adjuvant in Conjunctival Immunization. Investigative Ophthalmology & Visual Science (2016), 57(12).
10. Ana Filipović, Emilija Marinković, Ivana Lukić, **Radmila Đokić**, Ognjen Krnjaja, Dejana Kosanović, Aleksandra Inić-Kanada, Marija Gavrović-Jankulović, Marijana Stojanović. Recombinantly produced Banana Lectin stimulates Humoral and Cellular Immune Response in the Colon. 7. EFIS-EJI South Eastern European Immunology School, Bečići, Crna Gora, 16-19. Oktobar 2015.

11. Emilija Marinković, Ivana Lukić, Ana Filipović, Ognjen Krnjaja, **Radmila Đokić**, Marija Gavrović-Jankulović, Marijana Stojanović. In vitro assessment of immunomodulatory effects of recombinantly produced BanLec isoform on murine peritoneal macrophages. 7. EFIS-EJI South Eastern European Immunology School, Bečići, Crna Gora, 16-19. Oktobar 2015.

### **3. Саопштења на скуповима националног значаја, штампана као изводи у саплементу одговарајућег националног часописа или у књизи сажетак (M64)**

1. Marinković E, **Đokić R**, Filipović A, Lukić I, Kosanović D, Inić-Kanada A, Gavrović-Jankulović M, Stojanović M. The effect of prophylactic treatment of recombinant banana lectin on TNBS-induced colitis in BALB/c mice. Serbian Biochemical Society- 7<sup>th</sup> conference with international participation, Proceedings p157-158, 10. Novembar 2017.
2. Lukić I, Inić-Kanda A, Stein E, Marinković, Filipović A, **Djokić R**, Kosanović D, Schuere N, Ghasemian E, Barisani-Asenbauer T, Stojanović M, Uloga heterologe imunosti u otpornosti ka okularnim hlamidijalnim infekcijama. VIII Naučni sastanak Društva Imunologa Srbije, Beograd, Srbija, 27. April 2017.
3. Lukić I, Inić-Kanada A, Stein E, Marinković E, Filipović A, **Đokić R**, Barisani-Asenbauer T, Stojanović M. The role of heterologous immunity in resistance to ocular chlamydial infection. Serbian Biochemical Society- 7<sup>th</sup> conference with international participation, Proceedings p151-153, Beograd, 10. Novembar 2017.
4. Emilija Marinković, Ivana Lukić, Ana Filipović, **Radmila Đokić**, Dejana Kosanović, Aleksandra Inić-Kanada, M. Gavrović-Jankulović, Marijana Stojanović. Uticaj rekombinantne izoforme banana lektina na lokalni imunski odgovor u debelom crevu BALB/c miša. VII Naučni sastanak Društva imunologa Srbije, Beograd, Srbija, April 2016.

## **В. Образложење теме**

### **1. Научна област: Биохемија**

### **2. Предмет рада**

Предмет истраживања планираних докторском дисертацијом чији је предложени назив „Профилактичко дејство рекомбинантне изоформе лектина банане у запаљенским болестима црева: испитивање на моделу хемијски индукованог колитиса у миша “ су механизми којима лектин банане (БанЛек) остварује профилактички ефекат у случају запаљенских болести црева (енгл. *inflammatory bowel disease*; ИБД). У истраживањима, која ће доминантно бити рађена у моделу хемијски индукованог колитиса у миша, биће коришћена изоформа БанЛек-а произведена рекомбинантном технологијом (рБанЛек).

### **3. Научни циљ истраживања**

Главни циљ ове дисертације је да се испитају механизми који су у основи профилактичког дејства рБанЛек-а у ИБД. У оквиру тога планирано је да се испита:

- дозна зависност утицаја стимулације рБанЛек-ом на заступљеност и функционалне карактеристике популација имунских ћелија које имају ефекторску или улогу у иницијацији и регулацији локалног имунског одговора у дебелом цреву

- да се утврди да ли и на који начин специфичне карактеристике локалног имунског миљеа успостављеног услед стимулације рБанЛек-ом корелирају са током и интензитетом хемијски индукованог колитиса
- интеракција рБанЛек-а са микрофлором црева и функционалне последице тих интеракција

#### 4. Методе истраживања

Планирана истраживања ће обухватати *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro* тестирања. Сви планирани експерименти ће бити рађени у складу са 3R принципом (енгл. *Replace, Reduce, Refine*) и регулативом која се односи на рад са лабораторијским животињама, а према одобрењима Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине бр. 323-07-01577/2016-05/11 и бр. 323-07-03902/2017-05/1.

Окосницу истраживања ће представљати модел колитиса у миша индукованог етанолним раствором 2,4,6-тринитробензен сулфонске киселине (ТНБС). Пре индукције колитиса мишевима ће бити аплицирани (орално у дужем временском интервалу или једнократно интаректално) раствор дефинисане концентрације рБанЛек-а (0,5 – 50 µg/kg телесне тежине). Референтне групе ће представљати здрави мишеви одговарајућег соја, пола и старости који нису третирани или код којих је експериментални колитис индукован без претходног третмана рБанЛек-ом. Биолошки узорци (дебело црево, мезентерични лимфни чворови, фецес) ће бити сакупљани непосредно пре и у пику болести. Планирано је да се део тестирања уради у култури интестиналних епителних ћелија (утицај рБанЛек стимулације на функционалне карактеристике епителних ћелија, утицај рБанЛек на интеракцију са пробиотским сојевима који су изоловани из цревне микрофлоре миша и окарактерисани).

Анализе сакупљених биолошких узорака и узорака из ћелијских култура обухватаће анализу проточном цитофлуориметријом (фенотипска карактеризација локално присутних популација имунских ћелија), ELISA-у (продукција цитокина), *Western blot* (експресија транскрипционих фактора и протеина укључених у унутарћелијску сигнализацију), PCR-DGGE (праћење промена у саставу цревне микрофлоре), гасну хроматографију (продукција масних киселина лаког ланца) и колориметријске тестове (праћење параметара оксидативног стреса и активности ензима укључених у метаболизам аргинина). Биће урађена и хистолошка анализа узорака ткива дебелог црева (имунохистохемијска бојења праћена анализом на светлосном или конфокалном микроскопу).

За статистичку обраду података биће коришћен статистички програм *SPSS*.

#### 5. Актуелност проблематике у свету

ИБД представљају озбиљан здравствени проблем и њихова инциденца је на глобалном нивоу у сталном порасту. ИБД су патолошка стања танког и дебелог црева, и у хуманој популацији су описане две основне форме - Кронова болест и улцерозни колитис. Поред тога, код пацијената са ИБД често се јављају и екстраинтестинални поремећаји који додатно доприносе смањењу, примарном болешћу већ значајно нарушеног, квалитета живота (1).

ИБД карактерише значајно нарушавање локалне хомеостазе услед неадекватног имунског одговора на конституенте цревне микрофлоре или супстанце присутне у гастроинтестиналном тракту. Упркос бројним истраживањима, механизам настанка ИБД није у потпуности разјашњен. Доступни литературни подаци показују да на развој ИБД утичу генетски фактори, фактори животне средине и начин живота, укључујући и врсту намирница које се користе у исхрани. Ови фактори утичу како на сам настанак болести тако и на њен клинички ток (2).

Исхрана представља значајан аспект у превенцији и третману ИБД. Намернице које се користе у исхрани садрже бројне биоактивне супстанце које директно, делујући као имуномодулатори, или индиректно, нпр. као пребиотици, утичу на функционално стање локалног имунског система у цреву.

Банана је намирница која се широко користи у људској исхрани. Конзумирање банане позитивно утиче на гастроинтестинални систем и препоручује се и пацијентима са ИБД јер је показано да доприноси ублажавању клиничких симптома (3). Благотворно дејство банане на дигестивни тракт се углавном приписују високом садржају полифенола који испољавају антиоксидативно дејство и недигестибилним полисахаридним влакнима који делују као пребиотици. Друге биоактивне супстанце, попут БанЛек-а, су слабо проучене у овом контексту.

БанЛек је маноza-везујући лектин из фамилије жакалину-сличних лектина и у природи се јавља у више изоформи које се првенствено разликују у афинитету према циљним олигосахаридним структурама. Садржај БанЛек-а зависи од зрелости плода банане, али и сорте и фактора околине. У истраживањима се, због лакшег добијања у већим количинама и конзистентности у карактеристикама, користи и БанЛек произведен рекомбинантном технологијом (рБанЛек) који има висок степен структурне хомологије са природним изоформама и функционално се не разликује од њих (4). Могућност добијања у великој количини и са јасно дефинисаним својствима омогућава ширу примену рБанЛек-а, између осталог и као функционалног додатка храни. Имуномодулаторно дејство рБанЛек-а је показано *in vitro*, и у хуманом и у мишјем систему. рБанЛек делује као митоген Т ћелија, подстиче секрецију инфламаторних (IFN- $\gamma$ ) и регулаторних (IL-10) цитокина у суспензији мишјих спленоцита (5) и модулише функционалне карактеристике макрофага (6). Такође, рБанЛек, је стабилан у гастроинтестиналном тракту (7). Показано је да се рБанЛек везује за цревни епител и потом постепено прелази у субепителни простор. Стимулација рБанЛек-ом, на дозно зависан начин, доводи до промена у локалном цитокинском миљеу у дебелом цреву (8).

Истраживања на животињским моделима имају велики значај у развоју приступа за третман ИБД. Међу моделима који се најчешће користе су модели хемијски индукованих ИБД (9). У моделу експерименталног колитиса индукованог ТНБС-ом у мишу показано је да рБанЛек може имати профилактичко дејство тј. да дозно-зависно ублажава интензитет патологије у пику болести (10). У фокусу наведених истраживања није била карактеризација локалног имунолошког миљеа, првенствено са аспекта заступљености специфичних популација имунских ћелија, у тренутку индукције болести. Такође, до сада није описано да ли и на који начин рБанЛек утиче на микрофлору гастроинтестиналног тракта, важног фактора у настанку и развоју ИБД.

## Литература

1. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 12: 720–727
2. Strober W, Fuss I, Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 514-521
3. Halmos EP, Gibson PR. Dietary management of IBD – insights and advice. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 12(3): 133–146
4. Gavrovic-Jankulovic M, Poulsen K, Brckalo T, Bobic S, Linder B, Petersen A. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 929–941

5. Stojanovic MM., Zivkovic IP, Petrusic VZ, Kosec DJ, Dimitrijevic RD, Jankov R M, Dimitrijevic LA, Gavrovic-Jankulovic MD. In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform result in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. *Int Immunopharmacol* 2010; 10: 120–129
6. Marinković E, Đokić R, Lukić I, Filipović A, Inić-Kanada A, Kosanović D, Gavrović-Jankulović M, Stojanović M. Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. *PLoS ONE* 2017; 12(2): e0172469
7. Dimitrijevic R, Stojanovic M, Micic M, Dimitrijevic LJ, Gavrovic-Jankulovic M. Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator. *J Functi Food* 2012; 4: 636–641
8. Marinković E, Lukić I, Kosanović D, Inić-Kanada A, Gavrović-Jankulović M, Stojanović M. Recombinantly produced banana lectin isoform promotes balanced pro-inflammatory response in the colon. *J Func Foods* 2016; 20: 68-78
9. Boismenu R, Chen Y. Insights from mouse models of colitis. *J Leu Biol* 2006; 67(3): 267-278.
10. Emilija Marinković „Imunomodulatorna aktivnost rekombinane izoforme lektina iz banane u fiziološkim i patološkim uslovima u debelom crevu miševa BALB/c soja”, doktorska disertacija, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2017. godine

## 6. Очекивани rezultati

Realizacija istraživanja planiranih ovom doktorском дисертацијом требало би да резултује дефинисањем механизма који је у основи профилактоичког дејства рБанЛек-а у запаљенским болестима црева, и то:

- стицањем увида у рБанЛек-стимулацијом индуковане промене у локалној заступљености и функционалним карактеристикама ћелија имунског система које учествују у иницијацији, ефекторској фази и регулацији имунског одговора у дебелом цреву
- дефинисањем значаја специфичних ефекторских и регулаторних механизма за профилактоички исход третмана рБанЛек-ом мишјем моделу хемијски индукованог колитиса
- стицањем увида у утицај рБанЛек-а на састав и карактеристике микрофлоре дебелог црева, као и функционалне последице уочених промена

Више истраживања је показало дозну зависност исхода рБанЛек стимулације и тиме указало на неопходност обазривости при његовој примени. Стицање увида у механизме који су у основи профилактоичког дејства рБанЛек-а у ИБД омогућило би његову адекватну примену. Са друге стране, дефинисање имунолошких параметара у тренутку настанка болести који корелирају са ублажавањем клиничке слике у пику болест или евентуалном изостанку симптома, допринело би проналажењу нових супстанци и бољем дефинисању приступа за превенцију / третман ИБД.

## Г. Закључак

Комисија је мишљења да је предложена тема докторске дисертације научно заснована, оправдана и да се планираним начином реализације истраживања могу остварити дефинисани циљеви докторске дисертације.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета да Радмили Д. Миљковић, мастер-биологу, одобри израду докторске дисертације под насловом **„Профилактичко дејство рекомбинантне изоформе лектина банане у запаљенским болестима црева: испитивање на моделу хемијски индукованог колитиса у миша“**.

За менторе предлажемо проф. др Марију Гавровић Јанкуловић, редовног професора Хемијског факултета Универзитета у Београду и др Маријану Стојановић, научног саветника Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“.

У Београду, 28.08.2019.

Комисија:

1. др Марија Гавровић Јанкуловић, редовни професор  
Хемијског факултета Универзитета у Београду,

2. др Маријана Стојановић, научни саветник Института  
за вирусологију, вакцине и серуме – Торлак,

3. др Милица Поповић, доцент Хемијског факултета  
Универзитета у Београду