

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici Nastavno naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.03.2023. godine, broj 14/XIII-3/3-ĐJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj određivanja specifičnih IgE antitela na rekombinantne alergene u planiranju venom imunoterapije“

kandidata dr Dragane Jovanović, zaposlene u Klinici za alergologiju i imunologiju UKCS u Beogradu. Mentor je Prof. dr Aleksandra Perić-Popadić

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Branka Bonači-Nikolić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Vladimir Perović, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Goran Marjanović, profesor Medicinskog fakulteta u Nišu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Dragane Jovanović napisana je na ukupno 104 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 12 tabela, 16 grafikona (grafikon 1A-1D, 2, 3A-3J i 4) i 12 slika. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, zahvalnicu, biografiju kandidata, podatke o komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i u prilogu 2 publikovana rada napisana na osnovu rezultata doktorata.

U **Uvodu** je definisano šta su to reakcije preosetljivosti na Hymenoptera venome *Apis mellifera*, *Vespula spp.* i *Vespa crabo*, prevalenca rane preosetljivosti na Hymenoptera venome i faktori rizika za tešku sistemsku alergijsku reakciju (SAR) na Hymenoptera venome sa posebnim osvrtom na dijagnozu i selekciju pacijenata za specifičnu imunoterapiju. Pored prikaza spektra kliničkih prezentacija preosetljivosti na venome, obuhvaćena je i analiza značaja prisustva IgE antitela na prirodne i rekombinantne alergene: fosfolipazu A2 (engl. *Phospholipase A2*-Api m 1), hijaluronidazu (engl. *Hyaluronidase*-Api m 2), ikarapin (engl. *Icarapin*-Api m 10), antigen 5 (engl. *Antigen 5*-Ves v 5), fosfolipazu A1 (engl.

Phospholipase A1-Ves v 1) i antitela na unakrsno-reaktivne ugljenohidratne determinante (engl. *cross-reactive carbohydrate determinants-CCD*). Takođe je prikazan detaljan osvrt na dijagnostiku alergije prouzrokovane Hymenoptera venomima, posebno dijagnostiku kaja koristi pojedinačne rekombinantne alergene (engl. *Component-resolved diagnostics-CRD*) i test CCD-inhibicije. Posebna pažnja posvećena je vrstama rekombinantnih alergenima bez CCD i njihovoj ulozi u savremenoj molekularnoj alergološkoj dijagnostici. Objasnjeno je značaj CRD i testa CCD-inhibicije kod pacijenata koji imaju specifičnu IgE-reaktivnost istovremeno na više ekstrakta venoma, tj. pacijenata koji imaju višestruku-pozitivnost. Autor doktorske disertacije sažeto iznosi savremen dijagnostički pristup za detekciju prave senzibilizacije na venome kod pacijenata sa alergijom na Hymenoptera venome i izbor odgovarajućeg venoma za specifičnu imunoterapiju (VIT).

Ciljevi rada su precizno definisani. Ciljevi uključuju određivanje učestalosti dvostruke senzibilizacije na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene, kao i identifikaciju IgE-reaktivnosti na CCD; takođe, uključuju detekciju prisustva specifične IgE reaktivnosti na različite rekombinantne alergene pčele kod pacijenata alergičnih na venom pčele; zatim uključuju određivanje specifičnosti i senzitivnosti nalaza specifičnih IgE (sIgE) na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene pčele i ose ImmunoCAP i Immunoblot metodama i korelaciju ovih metoda za detekciju sIgE antitela. Jedan od ciljeva je i utvrđivanje efekta imunoterapije merenjem specifičnih IgG4 (sIgG4) na alergene pčele i ose.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o retrospektivnoj studiji kojom je obuhvaćeno u prvom delu istraživanja 82 pacijenta, a u drugom delu istraživanja 71 pacijent sa alergijom na Hymenoptera venome. Poglavlje sadrži opis Milerove klasifikacije težine sistemske alergijske reakcije na Hymenoptera venome, klasifikacione grupe pacijenata i opis testova koji su korišćeni za postavljanje dijagnoze alergije na Hymenoptera venome. Sadržaj metoda čini detaljan opis *in vitro* dijagnostičkih metoda ImmunoCAP fluoroenzimskog testa (*Thermo Fisher Scientific/Phadia*, Upsala, Švedska) i Immunoblot (*Euroimmun*, Germany, Euroline) koje koriste pojedinačne komponente. Detaljno je opisana ImmunoCAP metoda koja pretstavlja „zlatni standard“ u *in vitro* dijagnostici alergija, koja je korišćena za detekciju sIgE i sIgG4 antitela na ekstrakte venoma pčele, ose i stršljena i rekombinantne alergene fosfolipazu A2, antigen 5 i CCD. Takođe su opisane metode imunoblot: 1. Immunoblot (*Euroimmun*, Germany, Euroline, *the allergy profile DPA-Dx insect venoms 2*) za istovremenu detekciju sIgE antitela na ekstrakt venoma pčele, ekstrakt venoma ose, ekstrakt venoma stršljena, rekombinantnu fosfolipazu A2-rAp m 1, rekombinantni antigen 5-rVes v 5 i CCD; 2. Immunoblot (*Euroimmun*, Germany, Euroline, *the allergy profile DPA-Dx insect venoms 3*) za istovremenu detekciju sIgE antitela na ekstrakt venoma pčele, ekstrakt venoma ose, ekstrakt venoma stršljena, rekombinantnu fosfolipazu A2-rApi m 1, rekombinantnu hijaluronidazu-rApi m 2, rekombinantni ikarapin-rApi m 10, rekombinantni antigen 5-rVes v 1, rekombinantnu fosfolipazu A1-rVes v 5 i CCD. Opisano je i kvantitativno kategorisanje nivoa sIgE antitela u odgovarajuće klase. Detaljno se opisuje test CCD-inhibicije značajan za detekciju prave senzibilizacije na venome. Metode obuhvataju i opis dijagnostičke upotrebe bazalne serumske triptaze.

Na kraju ovog poglavlja je opisana metodologija statističke obrade podataka. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobreno je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i od strane Etičkog

komiteta Univerzitetskog Kliničkog Centra Srbije. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključenja u studiju.

U poglavlju **rezultati** izneti su detaljno originalni podaci dobijeni u ovom istraživanju, koji su sistematično prikazani u skladu sa zadatim ciljevima i u skladu sa tim podeljeni u sledeće odeljke: prvi, koji se tiče generalnih osobina ispitanika; drugi, koji se tiče analize prisustva sIgE antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene ImmunoCAP metodom; treći, u kojem se iznose rezultati poređenja dve metode ImunoCAP i Immunoblot za detekciju sIgE antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene; četvrti odeljak u kojem se analizira prisustvo sIgE antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene kao i značaj CCD inhibicije Immunoblot metodom u kliničkom radu (dijagnostički algoritam pre uvođenja imunoterapije); i u petom delu se razmatra detekcija nivoa sIgG4 antitela ImmunoCAP metodom.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 194 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Značaj određivanja specifičnih IgE antitela na rekombinantne alergene u planiranju venom imunoterapije“, autora dr Dragane Jovanović, utvrđeno ukupno podudaranje teksta iznosi 12%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je citata, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, tzv. opštih mesta i podataka, dok više od 5% od navedenih 12% podudarnosti proističe iz prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18). Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Analizom deskriptivnih podataka utvrđeno je da u istraživanju koje je obuhvatilo 82 pacijenta, osobe muškog pola (75,6%) imaju češće SAR u odnosu na osobe ženskog pola (24,4%). Prosečna starost u ovoj ispitivanoj grupi pacijenata je iznosila 46 godina (46,4±10,3). Utvrđeno je da većina pacijenata (67,1%) ima tešku SAR i da je teška SAR češća u grupi pacijenata sa višestrukom pozitivnošću u odnosu na grupu pacijenata sa jednostrukom pozitivnošću na ekstrakte venoma. Isto tako, utvrđeno je da višestruku pozitivnost na ekstrakte venoma ima više od 50% pacijenata.

U delu disertacije koji se bavi analizom prisustva specifične IgE reaktivnosti na rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5 ImmunoCAP metodom, utvrđeno je da 26% pacijenata sa SAR na Hymenoptera venome ima pravu dvostruku senzibilizaciju na obe

vrste venoma. Isto tako, utvrđeno je da težina SAR ne zavisi od koncentracije sIgE antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene. Dodatno, ustanovljeno je češće prisustvo CCD-sIgE antitela kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću na ekstrakte venoma i pacijenata alergičnih na venom pčele u odnosu na pacijente alergične na osu ili stršljen. Ističemo da je ovo prva studija o dijagnostičkom značaju rekombinantnih alergena kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću na ekstrakte venoma u jugoistočnom delu Evrope. Takođe, poređenjem ImmunoCAP i Imunoblot metoda, nađena je statistički značajna korelacija u detekciji specifičnih IgE antitela na ekstrakte venoma i rekombinantne alergene fosfolipazu A2 i antigen 5.

Analizom senzitivnosti i specifičnosti ImmunoCAP i Imunoblot metoda pokazano je da ImmunoCAP metoda ima veću senzitivnost i specifičnost od Imunoblot metode za detekciju sIgE antitela na ekstrakte venoma pčele i ose i rekombinantni antigen 5. Obe metode imaju visoku specifičnost za detekciju rekombinantne fosfolipaze A2. ImmunoCAP metoda je visoko specifična za detekciju rekombinantnih alergena fosfolipaze A2 i antigena 5 i visoko je senzitivna za detekciju kako ekstrakta venoma, tako i pomenutih rekombinantnih alergena. Pokazano je da korišćenje celih ekstrakta venoma daje „lažno-pozitivne“ rezultate i značajno redukuje specifičnost IgE testa. U skladu sa iznetim rezultatima, klinička istorija i molekularna dijagnostika su esencijalne za adekvatan izbor venoma za dugorajnu VIT, naročito kod pacijenata sa višestrukom senzibilizacijom i pacijenata koji ne mogu da identifikuju insekt koji je doveo do SAR.

U delu istraživanja koje je obuhvatilo 71 pacijenta prosečne starosti 47 godina ($46,9 \pm 15,1$) koje se odnosi na značaj molekularne alergološke dijagnostike koja koristi pojedinačne alergene tj. CRD za istovremeno određivanje IgE antitela na pet najvažnijih rekombinantnih alergena fosfolipaze A2, hijaluronidaze, ikarapina, antigena 5 i fosfolipaze A1, utvrđeno je da CRD značajno doprinosi povećanju senzibilizacije dijagnostike kod pacijenata sa SAR koji imaju negativne sIgE na ukupne venome insekata. Pored CRD, test CCD-inhibicije je koristan kod pacijenata koji imaju negativne sIgE na rekombinantne alergene. Zaključuje se da je molekularna dijagnostika veliki korak ka personalizovanoj medicini, posebno kod pacijenata koji su senzibilisani na alergene koji su nedovoljno zastupljeni u terapijskim smešama koje se koriste za VIT. S obzirom na složene profile senzibilizacije alergičnih pacijenata i nejednake distribucije relevantnih alergena u terapijskim ekstraktima, personalizovana terapija ima visok potencijal za superiornu efikasnost i izbegavanje *de novo* senzibilizacije. Pokazano je da je Imunoblot sa profilom od pet najvažnijih rekombinantnih alergena visoko senzitivna metoda za dijagnozu alergije na Hymenoptera. Isto tako, dokazano je da kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću koji imaju istovremeno i IgE-reaktivnost na CCD, test CCD-inhibicije povećava senzitivnost CRD i pomaže da se definišu pacijenti sa alergijom na pčelu kojima je potrebno proširenje panela rekombinantnih alergena. U ovom delu istraživanja prvi put su identifikovane različite grupe pacijenata koji su klasifikovani u pet podgrupa višestruko- i CCD-pozitivnih, koji dele karakteristične obrasce kliničke istorije i seroloških IgE-testova. Takođe je prvi put pokazano da test CCD-inhibicije ne treba izvoditi kod svih pacijenata sa pozitivnim CCD-sIgE antitelima.

Molekularna dijagnostika koja koristi pojedinačne alergene i test CCD-inhibicije pomažu sinergijski da se otkrije klinički relevantna, prava senzibilizacija i poboljšava izbor

odgovarajućeg venoma za dugotrajnu VIT. Shodno iznetim rezultatima, kreiran je algoritam za neophodne dijagnostičke korake koji obezbeđuju adekvatan terapijski pristup kod pacijenata sa alergijom na venom Hymenoptera.

Kako postoje stalni istraživački naponi za povećanje efikasnosti terapije i smanjenje vremena lečenja, tako postoji potreba da se identifikuju biomarkeri koji mogu efikasno predvideti efikasnost VIT. Shodno tome, imajući u vidu da detekcija alergena-specifičnih IgG4 antitela u serumu pomoću ImmunoCAP metode daje odgovarajuću procenu imunološkog odgovora tokom VIT, u delu istraživanja koji se odnosi na detekciju sIgG4 antitela ImmunoCAP metodom, ustanovili smo da je koncentracija sIgG4 antitela u fazi održavanja VIT nakon tri godine imunoterapije odgovarajućim venomom statistički značajno viša kod pacijenata na imunoterapiji venomom pčele nego kod pacijenata na imunoterapiji venomom ose.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Doktorska disertacija dr Dragane Jovanović sadrži pregledno i detaljno upoređene rezultate proistekle iz samog istraživanja sa relevantnim nalazima drugih autora koji su se bavili različitim aspektima molekularne dijagnostike kod pacijenata preostljivih na Hymenoptera venome.

Poređenjem dobijenih rezultata sa prethodnim istraživanjima, značajno veća učestalost muškog pola među pacijentima sa SAR na Hymenoptera venome opisana je od strane švajcarskih istraživača (Fehr i sar. 2019). Ovim istraživanjem je potvrđeno da nivoi IgE antitela nisu u korelaciji sa težinom sistemske alergijske reakcije što odgovara prethodno opisanim podacima proisteklim od strane nemačkih (Hollstein i sar. 2022) i švajcarskih (Fehr i sar. 2019) istraživača.

S obzirom da upotreba ekstrakta venoma za detekciju sIgE *in vitro* testovima može dovesti do „lažno-pozitivnih“ rezultata zbog njihove unakrsne reaktivnosti koja je najčešća zbog prisustva CCD do 50-60%, autor disertacije analizira zastupljenost CCD-sIgE antitela kod višestruko senzibilisanih pacijenata na Hymenoptera venome. Podaci iz disertacije potvrdili su sličnu učestalost ovih antitela kod višestruko senzibilisanih pacijenata što je u skladu sa ranije potvrđenim rezultatima o prisustvu CCD-sIgE antitela kod pacijenata preostljivih na venome insekata od strane austrijskih (Jin i sar. 2010), nemačkih (Blank i sar. 2010) i švajcarskih (Müller i sar. 2009) istraživača.

S druge strane mnogi pacijenti sa pravom dvostrukom senzibilizacijom mogu se detektovati upotrebom rekombinantnih alergena fosfolipaze A2 i antigena 5 koji su dostupni u rutinskoj *in vitro* dijagnostici i što je još važnije nisu strukturalno slični. Rezultati ImmunoCAP merjenja identifikovali su veoma visoku senzitivnost za ekstrakt ose i rekombinantni antigen 5-rVes v 5 kod pacijenata sa podacima o SAR na ubod ose (100% i 96,7%) i kod pacijenata sa podacima o SAR na ubod stršljena (100%) što je više u odnosu na podatke koji su objavljeni od strane švajcarskih (Müller i sar. 2009), austrijskih (Schrutzer i sar. 2016), nemačkih (Hofman i sar. 2011) i slovenačkih (Šelb i sar. 2016) istraživača koji su prijavili senzitivnost za rVes v 5 od 86,5% do 93%. Da je rVes v 5 dovoljan kod većine pacijenata za serološku potvrdu alergije na osu ili stršljen, osim autorovih istraživanja,

potvrđena je i od strane japanskih (Hirata i sar. 2015) i nemačkih (Hofman i sar. 2012) istraživača.

Senzitivnost ImmunoCAP za ekstrakt venoma pčele (100%) i rekombinantnu fosfolipazu-rApi m 1 (79,3%) kod pacijenata alergičnih na pčelu je slična ili veća u odnosu na podatke nemačkih (Hofman i sar. 2011), švajcarskih (Müller i sar. 2012) i japanskih (Yoshida i sar. 2015) istraživača. Senzitivnost metode za rekombinantnu fosfolipazu-rApi m 1 od 83,3% kod jednostruko-pozitivnih i 76,5% kod višestruko-pozitivnih potvrđuje da je fosfolipaza A2-Api m 1 jedan od glavnih alergena pčele. Iz ovoga proizilazi da je rekombinantna fosfolipaza A2-rApi m 1 dovoljna za potvrdu alergije na pčelu kod 80% pacijenata, ali za 20% pacijenata potrebno je dodatno IgE-testiranje, sa drugima rekombinantnim alergenima pčele.

Takođe, klinička dijagnoza alergije na venom pčele je preciznija ukoliko se u dijagnostici koriste istovremeno i drugi rekombinantni alergeni, pored rekombinantne fosfolipaza A2-rApi m 1, kao što su hijaluronidaza-rApi m 2 i ikarapin-rApi m 10 pokazali su rezultati ove disertacije i u skladu su sa podacima koji su objavljeni od strane nemačkih (Köhler i sar. 2014) istraživača.

S obzirom da CCD-sIgE antitela komplikuju tumačenje rezultata IgE-testa, molekularna dijagnostika koja koristi pojedinačne alergene, kao i test CCD-inhibicije su od pomoći u određivanju prave senzibilizacije kod pacijenata sa dokazanom višestrukompozitivnošću. Ovaj dijagnostički pristup je izuzetno važan za izbor odgovarajućeg venoma za dugotrajnu VIT i potvrđen je od strane švajcarskih (Müller i sar. 2012) i kineskih (Luo i sar. 2021) istraživača.

Detaljna analiza 29 višestruko- i CCD-sIgE pozitivnih pacijenata sa upotrebom CRD i testa CCD-inhibicije eliminisala je „lažno-pozitivne“ rezultate IgE-testa što je i pokazano u jednom istraživanju austrijskih (Aberer i sar. 2017) istraživača. Autor disertacije analizira zastupljenost sIgE-reaktivnosti na ekstrakte venoma i na pet rekombinantnih alergena, pre i posle CCD-inhibicije. Pregledom publikovanih istraživanja ustanovljeno je da je prvi put u ovom istraživanju pokazano da CCD-inhibiciju ne treba izvoditi kod svih CCD-sIgE pozitivnih pacijenata. Premda se radi o podacima koji do sada nisu publikovani od strane drugih istraživača, dobijeni rezultati su poslužili da se kreira algoritam za neophodne dijagnostičke korake koji obezbeđuju adekvatan terapijski pristup kod pacijenata sa SAR. Dodatno, uočeno je da je CCD-inhibicija posebno korisna u podgrupi višestruko pozitivnih pacijenata koji su pre CCD-inhibicije bili negativni na sve testirane rekombinantne alergene i u podgrupi pacijenata koji su imali sIgE-reaktivnost na rekombinantni antigen 5-rVes v 5. Kod ove dve podgrupe pacijenata, nakon CCD-inhibicije perzistirala je pozitivnost na ekstrakt venoma pčele, tako da je njima neophodna proširena CRD sa drugim, dodatnim rekombinantnim alergenima pčele.

Zbog mogućnosti štetnog efekta na budući ubod, a prema najnovijim EAACI smernicama za VIT *Sturma* i saradnika, nije pogrešno sprovoditi VIT sa dva venoma kod pacijenata sa istinskom dvostrukom pozitivnošću prema rezultatima CRD i CCD-inhibicije (Sturm i sar. 2018). U tom kontekstu, novootkrivena sIgE-reaktivnost na rekombinantne alergene pčele kod četiri pacijenta nakon CCD-inhibicije je veoma važna, jer kod ovih pacijenata treba razmotriti VIT zato što su u većem riziku za SAR.

Iznenadujuće, analiza sIgE-pozitivnih pacijenata nakon CCD-inhibicije dovela je do statistički značajnog povećanje nivoa sIgE na rekombinantnu fosfolipazu-rApi m 1 i rekombinantnu hijaluronidazu-rApi m 2 i statistički značajnog smanjenja nivoa sIgE na rekombinantni antigen 5-rVes v 5, što do sada niko od drugih istraživača nije pokazao. Ovi nalazi mogu biti uzrokovani različitom strukturom nativnih alergena venoma pčele i ose i poteškoćama u dobijanju prečišćenih rekombinantnih alergena. Nažalost, rekombinantni proteini mogu biti modifikovani post-translacionim modifikacijama u Goldžijevom aparatu eukariotskih ćelija i mogu da vezuju različite ugljene hidrate (Dicker i sar. 2015). Ključni delovi CCD su ostaci fukoze koji se javljaju u glikoproteinima insekata ili ostaci fukoze i ksiloze u biljnim glikoproteinima koji mogu predstavljati epitope za različite vrste imunoglobulina. Kod alergičnih pacijenata *Spilner* i saradnici su pokazali da nativni glikozilovani proteini pčele pokreću proizvodnju antitela svih podklasa sa različitim afinitetom za vezivanje za CCD (*Spilner* i sar. 2014). U disertaciji je postavljena hipoteza da rezultati CCD-inhibicije indirektno ukazuju da rekombinantni alergeni fosfolipaza A2-rApi m 1 i hijaluronidaza-rApi m 2 sadrže male količine CCD antigena, što može omogućiti antitelima različitih klasa da ometaju vezivanje sIgE za proteinske epitope pre CCD-inhibicije, dok nakon CCD-inhibicije zbog pristupačnosti epitopa za IgE, rezultira višim, pravim nivoima sIgE na rekombinantnu alergene. Nasuprot ovome, uzimajući u obzir da Ves v 5 nije prirodno glikozilovan (*Gibbs* i sar. 2008), postavljena je hipoteza da rekombinantni antigen 5-rVes v 5 može indukovati produkciju samo IgE antitela na proteinske epitope i da rVes v 5 u Imunoblotu sadrži male količine CCD antigena, što omogućava vezivanje sveprisutnih sIgE antitela na CCD. Još su *Jin* i saradnici istakli značaj stalnog kontakta sa glikoalergenima hrane u gastrointestinalnom traktu i polenom (glikozilovanim proteinima) na mukoznim površinama respiratornog sistema, koji mogu izazvati proizvodnju određenih nivoa IgE antitela usmerenih na CCD epitope (*Jin* i sar. 2008). S tim u vezi, autor disertacije pretpostavlja da ovaj fenomen dovodi do lažnih, viših nivoa IgE na rVes v 5 pre CCD-inhibicije i dolazi do zaključka da CCD-inhibicija smanjuje nespecifično vezivanje CCD-sIgE antitela što dovodi do pravih, nižih nivoa IgE antitela na rVes v 5. Dodatno, autor je pokazao da CCD-inhibicija može prevazići trenutna ograničenja nekih procedura u rekombinantnoj tehnologiji koja skriva ili daje izmenjenu prezentaciju pojedinih IgE epitopa kako je objašnjeno od strane austrijskih istraživača *Campana* i saradnika (*Campana* i sar. 2011), posebno u Imunoblotu koji ne prikazuje trodimenzionalnu konformacionu strukturu antigena. Rezultati disertacije ukazuju da CCD-inhibicija može prevazići tehnološke prepreke, a da je razvoj prečišćenih i konformacionih rekombinantnih proteina bez CCD važan korak u budućoj dijagnostici u alergologiji.

Predmet analize dokorske disertacije bio je i ispitivanje efekta imunoterapije merenjem sIgG4 antitela na alergene pčele i ose u fazi održavanja VIT. Istraživanja *Lee* i saradnika sa Harvarda u Bostonu su pokazala da odgovor B-ćelija podrazumeva prelazak proalergijskih B ćelija koje proizvode IgE ka B ćelijama koje potom proizvode IgG4 sa regulatornim fenotipom i posledičnim povećanjem sekrecije IL-10 i TGF-beta i da je prisustvo sIgG4 antitela od velikog značaja u ranim fazama VIT (*Lee* i sar. 2014). Iako se nivoi sIgG4 vremenom progresivno smanjuju, njihov uticaj na inhibiciju aktivacije bazofila ostaje, tako da blokirajuća sIgG4 antitela treba da imaju zaštitnu anti-inflamatornu ulogu.

Naime, ovim istraživanjem je pokazano da su pacijenti na imunoterapiji venomom pčele imali značajan porast nivoa sIgG4 u fazi održavanja VIT u odnosu na pacijente na imunoterapiji venomom ose. Ovi podaci su u skladu sa ranije potvrđenim rezultatima od strane američkih (Lee i sar. 2014), engleskih (Sahiner i sar. 2019) i švedskih (Jarkist i sar. 2020) istraživača koji su ustanovili da povišen nivo IgG4 može biti biomarker za efikasnost VIT jer je u korelaciji sa zaštitom od ponovnog uboda.

Autor disertacije u istraživanju na vrlo lep, jasan i sveobuhvatan način daje detaljan pregled do sada objavljenih rezultata koje dovodi u vezu sa efikasnošću imunoterapije. S obzirom da je ovakav dijagnostički pristup po prvi put ikada učinjen kod pacijenata sa alergijom na Hymenoptera venome u kojem su CRD i CCD-inhibicija veoma značajne u analiziranju preosetljivih pacijenata u kontekstu planiranja specifične dugotrajne imunoterapije, nameće se nesumnjivo ogroman značaj rezultata proisteklih iz ovog dela doktorske disertacije koji bi u budućnosti mogli imati i značajnu implikaciju u kliničkoj praksi.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Jovanovic D**, Peric-Popadic A, Djuric V, Stojanovic M, Lekic B, Milicevic O, Bonaci-Nikolic B. Molecular Diagnostics and Inhibition of Cross-Reactive Carbohydrate Determinants in Hymenoptera Venom Allergy. *Clin Transl Allergy*. 2023;e12230. <https://doi.org/10.1002/ct2.12230> M22 IF 5.657
2. **Jovanovic D**, Peric-Popadic A, Andrejevic S, Stojanovic M, Bonaci-Nikolic B. The diagnostic importance of recombinant allergen IgE testing in patients with hymenoptera venom allergy: Comparison of two methods. *Iran J Allergy, Asthma Immunol*. 2021;20(4):413–22. M23 IF 1.570
3. **Jovanović D**, Perić-Popadić A. Imunoterapija kod pacijenata sa prvim tipom preosetljivosti na Hymenoptera venome. *MedPodml*.2023; (DOI 10.5937/mp74-40715) M52

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Značaj određivanja specifičnih IgE antitela na rekombinantne alergene u planiranju venom imunoterapije“, dr Dragane Jovanović, kao prvi ovakav rad u našoj sredini predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju molekularne dijagnostike i planiranju imunoterapije.

Doktorska disertacija obiluje značajnim rezultatima koji definišu značaj molekularne metodologije u svakodnevnoj kliničkoj praksi alergologa koji razmatra sistemsku alergijsku reakciju prouzrokovanu Hymenoptera venomima. Specifično IgE-testiranje na rekombinantne alergene bez CCD je neophodno za adekvatnu selekciju venoma za dugotrajnu imunoterapiju, posebno kod pacijenata sa višestrukom pozitivnošću na ekstrakte venoma. Precizna identifikacija senzibilizacije na relevantni insekt je veoma važna za započinjanje imunoterapije i zato su CRD i CCD-inhibicija ImmunoCAP ili Imunoblot metodama važan

korak u dijagnostici. Nameće se nesumnjivo ogroman značaj rezultata proisteklih iz ovog dela doktorske disertacije koji bi u budućnosti mogli imati i značajnu implikaciju u kliničkoj praksi.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Dragane Jovanović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 05.04.2023.

Članovi Komisije:

Prof. dr Branka Bonači-Nikolić

Doc. dr Vladimir Perović

Prof. dr Goran Marjanović

Mentor:

Prof. dr Aleksandra Perić-Popadić
