

Хемијски факултет
Студентски трг 12 - 16
број захтева 131/6
датум 16.09.2010

Универзитет у Београду
Студентски трг 1
Веће научних области природних наука

З А Х Т Е В

за давње сагласности на Извештај о урађеној докторској дисертацији

Молимо Вас да сходно Закону о Високом образовању дате сагласност на извештај о урађеној докторској дисертацији кандидата **мр Лидије (Милован) Буразер, дипломираног хемичара**, под насловом:

"Испитивање стабилности алергенског препарата *Dermatophagoides pteronyssinus* за клиничку употребу".

Универзитет је дана **31.05. 2007.** дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

"Испитивање стабилности алергенског препарата *Dermatophagoides pteronyssinus* за клиничку употребу"

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **мр Лидије (Милован) Буразер** дипломираног хемичара, под насловом: **"Испитивање стабилности алергенског препарата *Dermatophagoides pteronyssinus* за клиничку употребу"**. образована је одлуком ННВ Хемијског факултета на седници од **31. маја. 2007. године** у саставу:

презиме и име	установа	звање	научна област
1. Јанков др Ратко	Хемијски факултет	редовни професор	биохемија
2. Гавровић-Јанкуловић др Марија Хем. факултет		ванредни професор	биохемија
3. Ћирковић-Величковић др Тања Хем. факултет		ванредни професор	биохемија
4. Димитријевић др Љиљана	Институт "Торлак"	научни саветник	биохемија

Наставно-научно веће Хемијског факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **16.09.2010. године**

Декан Хемијског факултета

проф. др Бранимир Јованчићевић

Прилог : 1. Извештај комисије са предлогом,
2. Акт наставно-научног већа о усвајању извештаја
3. Примедбе дате у току стављања извештаја на увид јавности
(уколико је таквих примедби било)

На основу члана 43. Статута Хемијског факултета чланови Наставно-научног већа Хемијског факултета су дана 16. септембра 2010. године донели следећу

О Д Л У К У

Члан 1.

Прихвата се Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације **мр Лидије (Милован) Буразер, дипломираног хемичара**, под насловом:

"Испитивање стабилности алергенског препарата *Dermatophagoides pteronyssinus* за клиничку употребу".

Члан 2.

Састав комисије за оцену и одбрану: **др Ратко Јанков, редовни професор (ментор), др Марија Гавровић-Јанкуловић, ванредни професор, др Тања Ћирковић-Величковић, ванредни професор, др Љиљана Димитријевић, научни саветник института за имунологију и вирусологију "Торлак".**

Члан 3.

Одлука ступа на снагу даном доношења.

Члан 4.

Одлуку, Извештај комисије и Захтев доставити надлежном органу Универзитета у Београду. Одлуку доставити члановима Комисије, докторанду и Архиви Факултета.

ДЕКАН ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

проф. др Бранимир Јованчићевић

NASTAVNO- NAUČNOM VEĆU
Hemijskog fakulteta
Univerzitet u Beogradu

Na sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 10. maja 2007. godine izabrani smo u Komisiju za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata mr Lidije Burazer, dipl. hemičara, pod nazivom:

„Ispitivanje stabilnosti alergenskog preparata *Dermatophagoides pteronyssinus* za kliničku upotrebu“

Podnetu disertaciju smo pregledali i podnosimo Nastavno-naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija mr Lidije Burazer pod navedenim naslovom napisana je na 71 strani, i sadrži 23 slike i tri tabele, a obuhvata sledeće odeljke: **Uvod** (3 strane), **Opšti deo** (25 strana), **Cilj rada** (1 strana), **Naši radovi** (16 strana), **Zaključak** (2 strane), **Eksperimentalni deo** (10 strana), **Citirana Literatura** (9 strana) i **Biografija** (1 strana). Pored navedenog, rad sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku (po dve strane), spisak objavljenih naučnih radova koji čine deo disertacije, sadržaj, listu korišćenih skraćenica i zahvalnicu.

U **Uvodu** Kandidat daje kraći osvrt na oblast istraživanja i temu svoga rada.

Opšti deo daje sažet opis reakcija preosetljivosti koji su do sada opisane u literaturi (Tip I - IgE, Tip II - IgG, Tip III - IgG, tip IV - Th1, Th2, CTL), sa posebnim osvrtom na mehanizam alergijske reakcije koja predstavlja prvi tip preosetljivosti. Drugi deo se odnosi na opis rane i kasne alergijske reakcije. Treći deo se bavi kontrolom simptoma alergijske inflamacije koja podrazumeva primenu: farmakoterapije (nesteroidni anti-inflamacioni lekovi, steroidni lekovi, antihistaminici, beta - 2 agonisti). Takođe se razmatra alergen specifična imunoterapija (ASIT), kao tretman koji može da utiče na tok bolesti, i anti-IgE terapija kojom se sistemski uklanja IgE iz organizma. Četvrti deo opisuje alergene i njihove biološke funkcije. Opisane su alergijske specifičnosti kućne prašine, koja predstavlja jedan od najvažnijih inhalatornih alergena po učestalosti u IgE posredovanoj senzitivizaciji. Posebano su opisani alergeni *Dermatophagoides pteronyssinus* koji predstavljaju sastavni deo kućne prašine a ujedno su i najznačajniji izvor alergena. U petom delu opisana je važnost očuvanja strukture i imunoheмиjske reaktivnosti ekstrakta namenjenog za pripremu vakcina u kliničkoj praksi kao i upotreba stabilizatora alergenskih ekstrakata.

Poglavlje **Naši radovi** se sastoje iz 2 celine, u okviru kojih Kandidat prikazuje rezultate svojih istraživanja. Ovo poglavlje obuhvata bioheмиjsku i imunoheмиjsku karakterizaciju ekstrakata *Dermatophagoides pteronyssinus* pripremljenih od liofilizovanih tela grinja nabavljenih od proizvođača sa tri kontinenta: Allergon iz Evrope, Bio Cen iz Južne Amerike, i CSL iz Australije. Pripremljeni ekstrakti grinja (A, B, i C) su upotrebljeni za pravljenje alergenskog preparata za *in vivo* kožno (PRICK) testiranje. Testiranje je obavljeno na sedamnaest osoba, od kojih četrnaest njih je imalo anamnestičke podatke koji su ukazivali na postojanje alergije na kućnu prašinu. *In vitro* dijagnostikom određen je stepen alergije testiranih pacijenata merenjem specifičnog IgE (sIgE, izraženo u klasama 0-6). Alergeni potencijal tri ekstrakata alergena analiziran je imnoblot tehnikom sa serumima pacijenata (klase 6 i klase 3). Na osnovu dobijenih rezultata odabran je ekstrakt C za pripremanje preparata za kliničku (sublingvalnu) primenu.

Stabilnost ekstrakta C koji je čuvan na temperaturi 4-8°C praćena je SDS-PAGE elektroforezom u periodu od 3 meseca. Stabilnost preparata koji su napravljeni u 4 terapijske koncentracije a potom čuvani na temperaturi 4-8°C u periodu od 12 meseci, praćena je ELISA inhibicijom. Preparati su ispitivani u 7 serijskih razblaženja.

U delu **Zaključci** Kandidat sumira najvažnije rezultate iz svoje disertacije, koje analizira u odnosu na podatke koji su opisani u literaturi.

U poglavlju **Eksperimentalni deo** Kandidat navodi detaljan opis biološkog materijala, hemikalija, reagenasa, tehnika i metoda koje je koristio u svom radu.

B: Kratak opis postignutih rezultata

Uticaj polazne sirovine na kvalitet vakcina za *in vivo* i *in vitro* dijagnostifikovanje alergije na *Dermatophagoides pteronyssinus* ispitivan je uvoj disertaciji. Za pripremu ekstrakata alergena korišćene su grinje dobijene od proizvođača sa tri kontinenta: Evrope (Allergon), Juzne Amerike (Bio Cen) i Australije (CSL). Analizom tri ekstrakta u redukujućim uslovima na 12% SDS PA gelu, pokazano je prisustvo proteinskih traka u opsegu od 14 do 116 kDa. Alergečne osobe koji su uključene u ovo ispitivanje bile su monosenzibilisane na grinje *Dermatophagoides pteronyssinus* (60%) sa jasnom kliničkom slikom (alergijski rinitis, alergijska astma). Preostale osobe su pored alergije na grinje imale alergiju na polene trava, korova i/ili životinjsku dlaku.

Alergenost proteina ispitana je imunoblot tehnikom korišćenjem seruma 6 alergičnih osoba sa kliničkom slikom alergijskog rinitisa i /ili astme i specifičnim IgE (d1) klasa 3 i 6. Dominantne proteinske trake koje su identifikovane su: 15, 25, 33, 45, 60 i 116 kDa, što odgovara molekulskim masama glavnih alergena (Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4 i Der p 11). U serumima alergičnih osoba klase 3 pokazan je jednostavan alergijski profil i nije zabeležena reaktivost u odnosu na glavne alergene (Der p 1 i Der p 2). U grupi alergičnih osoba nije uočena statistički značajna razlika u kožnoj reaktivnosti između ekstrakta A, B, i C. U CAP inhibiciji dva ekstrakta (A i C) su dostigla više od 90% inhibicije, dok je ekstrakt B dostigao 80% inhibicije. Značajna razlika u IgE reaktivnosti individualnih seruma zapažena je u imunoblotu za ekstrakt B. Alergeni potencijal ekstrakta C, koji je odabran za pripremanje preparata za kliničku upotrebu, dostigao je 93% inhibicije.

Stabilnost vakcina koje su pripremljene za sublingvalnu imunoterapiju osoba alergičnih na grinje ispitivana je ELISA inhibicijom. Od vakcine označene SLIT 3 (koncentracija 1000 PNU), serijskim razblaženjem (1:7, v/v) pripremljene su vakcine SLIT 2, SLIT 1, i SLIT 0. Pored stabilnosti polazne vakcine, ispitivana je stabilnost serijskih razblaženja (1:5, 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000), u tri vremenska intervala (nultom, nakon 3 i nakon 12 meseci). Maksimalnu inhibiciju od 100% pokazali su sve tri vakcine (SLIT 0, SLIT 1, SLIT 2 i SLIT 3) u nultom vremenu, nakon 3 meseca, dok do značajnog pada inhibicije dolazi kod vakcine SLIT 0 pri razblaženju 1:10 (56%) i vakcine SLIT 1 pri razblaženju 1:100. Pad inhibicije zabeležen je kod vakcine SLIT 3 pri razblaženju 1:1000. Činjenica da su vakcine SLIT 0, SLIT 1, SLIT 2, i SLIT 3, čuvane na temperaturi od 4-8°C, zadržale visok procenat inhibicije (preko 80%) i nakon 12 meseci govori u prilog dobre metode ekstrakcije i izabranog stabilizatora (50% glicerol).

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da ispitivani ekstrakti *Dermatophagoides pteronyssinus*, napravljeni od čiste kulture liofilizovanih grinja sadrže proteinske trake u saglasnosti sa literaturnim podacima. Glavni alergeni koji su opisani u literaturi za ovaj alergenski izvor, najučestaliji su alergeni i za populaciju alergičnih pacijenata na Dpt sa našeg područja. Rezultati nedavno objavljene studije koja se bavila analizom komercijalno dostupnih ekstrakata grinja za *in vivo* dijagnozu pokazala je da je

alergeni profil ekstrakta različitih proizvođača heterogen. U ovoj disertaciji analizirani ekstrakti, pripremljeni od grinja dobijenih od tri proizvođača, pokazali su da su alergeni profili ekstrakta A i C kompleksni i u izvesnoj meri uporedivi, za razliku od ekstrakta C.

Vakcine protiv alergije namenjene za kliničku upotrebu mogu ostvariti značajan terapijski efekat samo ukoliko su očuvane alergene komponente i u ekstraktima gde se zastupljene proteaze. Glicerol je veoma efikasan "zaštitnik" proteina kako od adsorpcije za čvrstu fazu tako i od proteolize, što doprinosi stabilnosti alergnog potencijala vakcine. Studije optimizacije pokazale su da kod gotovo svih ispitivanih ekstrakata, koncentracija glicerola od 50% postiže maksimalan nivo stabilnosti mereno funkcionalnim (kožni test, imunoesej) tako i nefunkcionalnim (fizičke karakteristike) testovima. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su u saglasnosti sa literaturnim podacima, i ukazuju da je 50% glicerol dobar stabilizator vakcina za kliničku upotrebu. Danas je 50 % glicerol široko primenljiv stabilizator u velikom broju proizvoda namenjenih dijagnozi i tretmenu alergijskih bolesti.

D.Objavljeni radovi ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

M21

1. Lidija Burazer, Katrarina Milovanovic, Mina Milovanovic, Olga Vuckovic, Tanja Cirkovic Velickovic, Marija Gavrovic-Jankulovic. **Impact of *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body raw material on house dust mite allergy diagnosis in Serbian population.** *Medical and Veterinary Entomology*, in press (IF 2010 2,09)

M23

1. Lidija Burazer, Katarina Milovanović, Tanja Ćirković Veličković, Marija Gavrović-Jankulović. **Stability evaluation of house dust mite vaccines for sublingual immunotherapy.** *J. Serb. Chem. Soc.* 75 (1) 19–26 (2010) (IF 0.8)

Saopšteni rezultati na međunarodnim skupovima:

1. Burazer L, Ćirković T. **Immunochemical investigation of dermatophagoides pteronisinus and cockroach extracts.** *Supp.Allergy* 2001; p 884

2. Milovanovic K, Burazer L, Vuckovic O, Cirkovic Velickovic T, Gavrovic-Jankulovic M: **Different profiles of IgE reactivity to house-dust mite proteins in Serbian population, XXV Congres of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Vienna**, poster presentation, EAACI, Abstracts book, pp. 279, 10-14 June 2006

3. Lidija Burazer, Katarina Milovanović, Olga Vučković, Tanja Veličković'Ćirković, Marija Gavrović Jankulović: **Investigation of sublingual allergen vaccines stability by ELISA inhibition method** ;The 29th EAACI Congress London, United Kingdom 5-9 June 2010 - **Abstract No. 650**

Ostali radovi kandidata iz oblasti:

M21

1. Blanus M, Perovic I, Popovic M, Polovic N, Burazer L, Milovanovic M, Gavrovic-Jankulovic M, Cirkovic Velickovic T. **Quantification of Art v 1 and Act c 1 being major allergens of mugwort pollen and kiwi fruit extracts in mass-units by ion-exchange HPLC-UV method.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;857(2):188-94.
2. Polovic N, Blanus M, Gavrovic-Jankulovic M, Atanaskovic-Markovic M, Burazer L, Jankov M, Cirkovic Velickovic T. 2007. **A matrix effect in pectin-rich fruits hampers digestion of allergen by pepsin in vivo and in vitro.** *Clinical and Experimental Allergy* 37:754-762
3. Cirkovic T, Gavrovic-Jankulovic M, Prisc S, Jankov RM, Burazer L, Vuckovic O, Sporic Z, Paranos S. 2002. **The influence of a residual group in low-molecular-weight allergoids of Artemisia vulgaris pollen on their allergenicity, IgE- and IgG-binding properties.** *Allergy* 57: 1013-20
4. Gavrovic-Jankulovic M, Cirkovic T, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, Petersen A, Gojgic G, Burazer L, Jankov RM. 2002. **Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen.** *J Allergy Clin Immunol* 110: 805-10

M23

1. Katarina Milovanović, Lidija Burazer, Olga Vučković, Marina Atanacković-Marković, Tanja Ćirković Veličković, Ratko M. Jankov and Marija Gavrović-Jankulović. **Isolation and characterization of the 68 kD allergen from house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*.** *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (5) 513–522 (2009)
2. Polovic ND, Cirkovic Velickovic T, Gavrovic-Jankulovic M, Burazer L, Dergovic-Petrovic D, Vuckovic O, Jankov RM. 2004. **IgG binding of mugwort pollen allergens and allergoids exposed to simulated gastrointestinal conditions measured by a self-developed ELISA test.** *J. Serb. Chem. Soc.* 69: 533-40
3. Gavrovic-Jankulovic M, Cirkovic T, Burazer L, Vuckovic O, Jankov RM. 2002. **IgE cross-reactivity between meadow fescue pollen and kiwi fruit in patients' sera with sensitivity to both extracts.** *J Invest Allergol Clin Immunol* 12: 279-86

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)

Doktorska disertacija mr biohemije Lidije Burazer je originalni naučni doprinos u izučavanju kvaliteta i stabilnosti preparata *Dermatophagoides pteronyssinus* koji je namenjen za primenu u kliničkoj praksi. U ovoj disertaciji urađena je uporedna biohemijska i imunohemijska analiza tri ekstrakta grinja, sa ciljem da se odabere najpotentniji ekstrakt za pripremanje vakcine za sublingvalnu imunoterapiju. Dobijeni rezultati ukazuju da je ispitivani uзорak (ekstrakt) zadovoljio osnovne kriterijume za primenu u i *in vivo* i *in vitro* dijagnostici, kao i da Dpt vakcine namenjene sublingvalnoj imunoterapiji zadržavaju potrebnu potentnost (preko 50%) u deklarisanom vremenskom roku pri definisanim uslovima čuvanja (4-8 °C, 12 meseci). Tema kojom se Kandidat bavio veoma je značajna za uspostavljanje tačne dijagnoze za alergične

osobe na grinje u našem podneblju, s obzirom da je pokazano da alergija na grinje ima različit klinički i imunološki profil u različitim geografskim područjima. Pored važnosti za dijagnostifikovanje alergije, Kandidat je pokazao da je kvalitet polaznog materijala za pripremu vakcine vrlo važan za pravilan odabir pacijenata za alergen-specifičnu imunoterapiju. Rezultati ove disertacije su objavljeni u dva rada (jedan M21, i jedan M23) i tri saopštenja na međunarodnim skupovima.

Na osnovu svega navedenog Komisija predlaže Naučno nastavnom veću Hemijskog fakulteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju mr Lidije Burazer **„Ispitivanje stabilnosti alergenskog preparata *Dermatophagoides pteronyssinus* za kliničku upotrebu“** i odobri njenu javnu odbranu.

U Beogradu, 31.08.2010.

Komisija:

Dr Marija Gavrović-Jankulović, vanredni profesor,
Hemijski fakultet, Beograd

Dr Tanja Ćirković Veličković, vanredni profesor,
Hemijski fakultet, Beograd

Dr Ratko M. Jankov, redovni profesor,
Hemijski fakultet, Beograd

Dr Ljiljana Dimitrijević, naučni savetnik,
Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd