

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУРШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/338

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

12.1.2023.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације
и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине
имунокомплекса у дијагностичке сврхе

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Тамара (Небојша) Ђукић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у
Крагујевцу,

Факултет медицинских наука, Интегрисане академске студије, Магистар фармације

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2018.

4. Година уписа на докторске студије: 2019.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ 1 :

Име и презиме ментора: др Бранко Бугарски

Звање: Редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитет у Београду

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. IT Drvenica, AZ Stančić, A. Kalušević, S. Marković, J. Dragišić Maksimović, VA Nedović, **BM Bugarski**, VLj Ilić. Maltose-mediated long-term stabilization of freeze- and spray- dried forms of bovine and porcine hemoglobin. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2019; 84 (10) 1105-1117, IF (2019) =1, 097 (ISSN 0352-5139).
2. Kostić I, Ilić V, Đorđević V, Bukara K, Mojsilović S, Nedović V, Bugarski D, Veljović Đ, Mišić D, **Bugarski B.** Erythrocyte membranes from slaughterhouse blood as potential drug vehicles: Isolation by gradual hypotonic hemolysis and biochemical and morphological characterization. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, 2014, 122: 250–259, IF(2014)=4,152 (ISSN 0927-7765).
3. Stančić, A. Z., Drvenica, I. T., Obradović, H. N., **Bugarski, B. M.**, Ilić, V. L., & Bugarski, D. S. Native bovine hemoglobin reduces differentiation capacity of mesenchymal stromal cells in vitro. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 144: 909-920, IF(2020)=6,953 (ISSN 0141-8130).
4. Stojanović, R., Ilić, V., Manojlović, V., Bugarski, D., Dević, M., & **Bugarski, B.** Isolation of hemoglobin from bovine erythrocytes by controlled hemolysis in the membrane bioreactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2012, 166(6): 1491-1506. IF(2012)=1,893, (ISSN 0273-2289).
5. Bukara, K., Jovanić, S. Z., Drvenica, I. T., Stančić, A., Ilić, V., Rabasović, M. D., Pantelić, D.V., Jelenković B.M., **Bugarski B.**, & Krmpot, A. J. Mapping of hemoglobin in erythrocytes and erythrocyte ghosts using two photon excitation fluorescence microscopy. *Journal of biomedical optics*, 2017, 22(2): 026003, IF(2017)=2,56 (ISSN 1083-3668).

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ 2:

Име и презиме ментора: др Весна Илић

Звање: научни саветник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања, Институт од националног значаја за Републику Србију

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Kovačić M, Natalija Fratrić, Aleksandra Arsić A, Mojsilović SI, Drvenica I, Marković D, Maslovarić I, Grujić Milanović J, Ivanov M, **Ilić V**. Structural characteristics of circulating immune complexes in calves with bronchopneumonia: Impact on the quiescent leukocytes. *Research in Veterinary Science*, 2020, Pages 63-74, IF(2020)=2,37 (ISSN 0034-5288).
2. Fratrić N, Gvozdić D, Vuković D, Savić O, Buač M, **Ilić V**. Evidence that calf bronchopneumonia may be accompanied by increased sialylation of circulating immune complexes` IgG. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2012, 150: 161– 168, IF(2012)=1,87 (ISSN 0165-2427).
3. IT Drvenica, AZ Stančić, A. Kalušević, S. Marković, J. Dragišić Maksimović, VA Nedović, BM Bugarski, **VLj Ilić**. Maltose-mediated long-term stabilization of freeze- and spray- dried forms of bovine and porcine hemoglobin. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2019; 84 (10) 1105-1117, IF(2019)=1,097 (ISSN 0352-5139).
4. Dobričić V, Drvenica I, Stančić A, Mihailović M, O Čudina O, Bugarski D, **Ilić V**. Investigation of Metabolic Properties and Effects of 17β-carboxamide Glucocorticoids on Human Peripheral Blood Leukocyte. *Archiv der Pharmazie*, 2018, 351(5):e1700371, IF (2018)=2,07 (ISSN 0365-6233).
5. Kostić I, **Ilić V**, Đorđević V, Bukara K, Mojsilović S, Nedović V, Bugarski D, Veljović Đ, Mišić D, Bugarski B. Erythrocyte membranes from slaughterhouse blood as potential drug vehicles: Isolation by gradual hypotonic hemolysis and biochemical and morphological characterization. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, 2014, 122: 250–259, IF (2014)=4,152 (ISSN 0927-7765).
6. Nikodijević S, Blagojević V, Ćuruvija I, Kosanović D, Djukić T, Djordjević B, **Ilić V**, Minić R. Selectivity of polyclonal repertoire of anti-microbial IgA and its subclasses in saliva and serum in humans. *Scand J Immunol*. 2022 Dec;96(6):e13223, IF(2022)=3,487 (ISSN 0300-9475).
7. Knežević S, Kosanović D, Dragačević L, Živković I, **Ilić V**, Hajduković L, Savić O, Minić R. Age and gender associated changes in immunoglobulin subclass levels specific to *S. pneumoniae*, serotype 1. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2022 Aug;87:101834. IF(2022)=2,76 (ISSN 0147-9571).

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф.дрПетарУскоковћ

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл.43. Правилника о докторским студијама ТМФ-а на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 29.12.2022. године, донета је

О Д Л У К А

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

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације **Тамаре Ђукић**, број индекса 4033/19, под називом: **„Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“**.

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

За менторе се одређују др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Весна Илић, научни саветник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања, Институт од националног значаја за Републику Србију.

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

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

Предмет: Подобност теме и кандидата Тамаре Ђукић, магистра фармације, за израду докторске дисертације

Одлуком бр. 35/271 од 22. новембра 2022. године, од стране Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата **Тамаре Ђукић, магистра фармације**, за израду докторске дисертације и научне заснованости теме

„Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Тамара Ђукић, магистар фармације, рођена је 27. јуна 1994. године у Крушевцу. Основну школу “Јован Курсула”, као и гимназију (природно-математички смер) завршила је у Варварину са одличним успехом. Школске 2013/2014. године уписује Интегрисане академске студије фармације на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Интегрисане академске студије је завршила у октобру 2018. године, са просечном оценом 9,23 и оценом 10 на одбрани завршног мастер рада. Током студија била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја. У јулу 2018. године учествовала је на једномесечној размени за студенте фармације, на Фармацеутском факултету у Кракову (Пољска), где је обављала праксу на катедри за медицинску хемију. Након завршених студија фармације, одрадила је приправнички стаж у трајању од 6 месеци и положила државни испит за стицање лиценце магистра фармације.

Докторске академске студије је уписала школске 2019/2020. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија под менторством проф. др Бранка Бугарског, редовног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду. Изабрана је у звање истраживач-приправник 25. јуна 2020. године, а од 1. августа 2020. године је запослена у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у Београду. Као студент докторских студија била је учесник Еразмус+ програма мобилности у трајању од 3 месеца (јун-септембар 2021. године) на Пољопривредном факултету Универзитета у Атини, Грчка (*Agricultural University of*

Athens, Greece) у лабораторији за хемију (*Department of Food Science and Human Nutrition, Laboratory of Chemistry*).

Од јануара 2021. године Тамара Ђукић ангажована је на пројекту *MultiPromis - Multifunctional leaf protein and assembled nanocarrier structures delivered by enzyme technology* којим руководи проф. др Зорица Кнежевић-Југовић у оквиру програма „Идеје“ Фонда за науку Републике Србије.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Тамара Ђукић је положила све испите предвиђене планом и програмом докторских студија, са просечном оценом 8,82 као и завршни испит са темом „Могућност примене фотон корелационе спектроскопије за анализу *in vivo* и *in vitro* формираних агрегата молекула антитела“, са оценом 10. У Табели 1 је дат списак положених испита на докторским студијама:

Табела 1. Положени испити, оцене и остварени бодови у оквиру докторских студија.

Предмет	Оцена	ЕСПБ
Математичка обрада експерименталних података	7	5
Биохемијска кинетика	10	5
Физичко-хемијске основе фармацеутског инжењерства	10	4
Реологија полимера	8	6
Биоактивне материје у козметичким производима	10	4
Одабрана поглавља биохемије-витамини	10	5
Хемијска кинетика	6	5
Полимерни биоматеријали	10	5
Одабрана поглавља инструменталне анализе	8	7
Индустријска микробиологија	8	5
Енглески језик	10	/
Завршни испит	10	30
Укупно	8,82	81

У оквиру свог научно-истраживачког рада Тамара Ђукић се бави истраживањем у области имунохемије, односно физичко-хемијске карактеризације имунокомплекса у сарадњи са Институтом за медицинска истраживања Универзитета у Београду, у групи за Имунологију. На основу досадашњих резултата ових истраживања проистекао је један рад у међународном часопису (M23), једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34), и два саопштења са домаћег скупа штампана у изводу (M64). У припреми је један рад предвиђен за публикавање у међународном часопису категорије M21 или M22.

Списак објављених научних и стручних радова:

Радови у међународним часописима (M23):

Nikodijević S, Blagojević V, Ćuruvija I, Kosanović D, **Djukić T**, Djordjević B, Ilić V, Minić R. Selectivity of polyclonal repertoire of anti-microbial IgA and its subclasses in saliva and serum in humans. *Scand J Immunol*. 2022 Oct 6:e13223. doi: 10.1111/sji.13223. Epub ahead of print. PMID: 36203413.

(2021: Имунологија 102/163; IF: 3,889)

Саопштења са скупа од међународног значаја штампано у изводу (M34):

Djukić T, Drvenica I, Majerić D, Maslovarić I, Šefik-Bukilica M, Marković D, Kovačić M, Miletić M, Ilić V. Photon correlation spectroscopy analysis of circulating immune complexes in rheumatoid arthritis, *6th European Congress of Immunology*, Virtual meeting, 1-4 September, 2021., Abstract Book, P-0530, pp. 389 (ISSN: 0014-2980)

Саопштења са домаћег скупа штампано у изводу (M64)

Тамара Ђукић, Маријана Ковачић, Ивана Дрвеница, Ирина Масловарић, Соња Мојсиловић, Мирјана Шефик Букилица, Рајна Минић, Драгана Марковић, Драгана Мајерич, Маја Милетић, Весна Илић. Нова метода анализе величине имунокомплекса код болесника са реуматоидним артритисом. *Трећи конгрес биолога Србије*, 2022, Златибор, Србија 21–25.септембар 2022. Књига сажетака, страна 349, www.serbiosoc.org.rs.

Илић В, Мајерич Д, Марковић Д, Масловарић И, Минић Р, Дрвеница И, **Ђукић Т**, Брајовић Г, Хаџи-Михајловић М, Милетић М, Шефик Букилица М, Ковачић. Хуморални имунски одговор у локалним и системским болестима коштаног ткива. *Трећи конгрес биолога Србије*, 2022, Златибор, Србија 21-25.септембар 2022. Књига сажетака, страна 337, www.serbiosoc.org.rs.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и остварених резултата током докторских студија можемо констатовати да је Тамара Ђукић, магистар фармације, показала изузетну склоност и способност за бављење научноистраживачким радом. Способна је да самостално креира и реализује истраживања у вези са темом докторске дисертације, али се и одлично сналази у тимском раду на истраживањима у оквиру пројекта на коме је ангажована. Аутор је једног рада објављеног у међународном часопису, једног саопштења са међународног скупа штампаног у изводу и два саопштења са националног скупа штампаног у изводу. На основу биографских података кандидата, њених научних и стручних доприноса, као и објављених радова, Комисија сматра да је кандидат подобан

за ефикасан теоријски и експериментални рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет истраживања ове дисертације представља испитивање теоретске и практичне могућности примене фотон корелационе спектроскопије за анализу величине колоидних честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса (енглески: *circulating immune complexes*; *CIC*). Фотон корелациона спектроскопија (енглески: *photon correlation spectroscopy*), такође позната као динамичко расипање светлости (енглески: *dynamic light scattering*; синоним: *quasi-elastic light scattering*) је техника којом се у колоидним системима одређује величина честица и расподела честица по величини. Ова метода је постала широко прихваћени аналитички метод у истраживањима у оквиру природних, бимедицинских и наука о материјалима, као и индустријским процесима контроле квалитета, јер се њоме могу детектовати честице и агрегати честица величине од 1 nm до 5 μ m. Фотон корелациона спектроскопија је погодна метода за детекцију и праћење деградације макромолекула, њихове хомо- и хетероолигомеризације, полимеризације (укључујући и ензимски катализовану), као и за праћење формирање макромолекулских кластера у реалном времену.

Постоји мали број студија чији су резултати потврдили да се методом фотон корелационе спектроскопије може детектовати присуство и анализирати величина имунокомплекса, макромолекулских агрегата формираних након везивања антигена и антитела. Формирање имунокомплекса је неопходан део нормалног, физиолошког имунског одговора, и предуслов за ефикасно уклањање антигена (патогена) из организма. Биолошка функција имунокомплекса је одређена структуром и количином антитела која их формирају, структуром и количином антигена као и саставом других молекулских конституената који се налазе у саставу имунокомплекса. Поред молекулског састава, биолошка функција имунокомплекса је одређена и њиховом величином. Од величине имунокомплекса зависи и ефикасност њиховог уклањања из циркулације што представља нормалну фазу у имунском одговору која започиње након елиминације антигена из организма. Међутим од величине имунокомплекса зависи и њихов патогени потенцијал који настаје као резултат неефикасног уклањања имунокомплекса и њиховог таложења у ткивима. Уобичајене клиничке манифестације болести посредованих имунокомплексима укључују гломерулонефритис, синовитис и дермални васкулитис. Серумска болест, системски еритематозни лупус и хронични васкулитис повезан са инфекцијом су прототипске болести имунокомплекса, мада је и низ других болести повезан са неефикасним уклањањем имунокомплекса. Реуматоидни артритис је аутоимуна болест коју карактерише присуство имунокомплекса у чијем се саставу налазе реуматоидни фактори (енглески: *rheumatoid factors*, *RF*), аутоантитела која реагују са сопственим IgG антителима, тј. епитопима IgG молекула које се на њима испољавају након везивања са антигеном. Количина, састав и величина имунокомплекса у циркулацији (CIC) у реуматоидном артритису одређује, између осталих фактора, тежину клиничке слике. Изучавање величине и структуре имунокомплекса није само од значаја за испитивање патогенетских механизма и дијагностику природно насталих болести

посредованих имунокомплексима, већ има велики значај за праћење ефеката (и позитивних и негативних) протеинских биотерапеутика. Наиме, од како је почела интензивнија примена моноклонских антитела као терапеутика, све више се обраћа пажња и на формирање имунокомплекса између терапеутског антитела (који у овом случају представља антиген) и антитела домаћина, јер они утичу и на ефикасност терапије и појаву нежељених инфламаторних реакција, које је у многоме зависе и од величине формираних имунокомплекса.

Одређивање величине имунокомплекса у системској циркулацији није део рутинске дијагностике болести посредованих имунокомплексима. Методе које се најчешће користе за анализу величине имунокомплекса су ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе, гел филтрација, ултрафилтрација, електрофореза и електрофокусирање и микроскопске технике. Већина ових метода су релативно компликоване и захтевају доста времена за извођење. Због ових методолошких ограничења оне се примењују у базичним истраживањима структуре и функције имунокомплекса, али нису нашле своје место у рутинској дијагностици болести које су њима посредоване. Резултати малог броја студија су показали да се и фотон корелациона спектроскопија може применити за анализу величине честица које улазе у састав *in vitro* и *in vivo* формираних имунокомплекса.

Велика предност фотон корелационе спектроскопије је то што се релативно брзо изводи, не захтева посебну припрему узорка, а након анализе узорак се може користити за даље анализе. Потребно време за извођење методе, уз вишеструко понављање мерења, и софтверску обраду података, не прелази 30 минута. Међутим, проблем представља то што ова метода није стандардизована за потребе рутинске дијагностике. Један од разлога за то, је пре свега што је већина комерцијално доступних апарата опремљена софтверима који структуру колоидних честица апроксимирају као сферу, а молекули имуноглобулина одступају од сферног облика. Други проблем представља то што имунокомплекси по својој суштини, тј. због хетерогености молекулског састава, представљају полидисперзне узорке што понекад чини немогућим исправно „софтверско“ тумачење добијених резултата.

Циљ истраживања ове дисертације је стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса код људи за потребе дијагностике болести и стања која су посредована имунокомплексима. На основу дистрибуције величине колоидних честица СИС здравих особа, као референтног система, биће процењена промена величине колоидних честица СИС у болестима посредованим имунокомплексима (на моделу реуматоидног артритиса), чиме ће се потврдити могућност примене ове методе за анализу величине честица у саставу природно формираних имунокомплекса у другим инфективним и аутоимуним болестима, или имунокомплекса формираних као одговор организма на класичне лекове или протеинске биотерапеутике.

Како би се остварио овај циљ планирано је да се експериментални део дисертације реализује кроз три главне фазе, односно следеће специфичне циљеве:

А) Анализа величине колоидних честица нативних имуноглобулина Ге (енглески: *immunoglobulin G*; IgG) и IgG агрегираних топлотом (*in vitro* аналога имунокомплекса) и *in vitro* формираних имунокомплекса:

- Изоловање хуманих IgG из периферне крви здравих особа;
- Формирање *in vitro* аналога имунокомплекса агрегирањем нативних IgG топлотом;
- *In vitro* формирање имунокомплекса између IgG и моноклонских антитела миша специфичних за к лаке ланце имуноглобулина.
- Анализа величине нативних и агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и сканирајућом електронском микроскопијом (енглески: *scanning electron microscopy*; SEM);
- Мерење величине колоидних честица у препаратима нативних и агрегираних IgG фотон корелационом спектроскопијом и одабир оптималне методе анализе (*cumulant* и/или *corenn* и/или *contin*) на основу поређења/корелирања са резултатима ултрацентрифугирања, гел филтрације и SEM, тј. са резултатима „стандардних“ метода анализе величине и структуре нативних и агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса;
- Дефинисање вредности ζ (електрокинетичког) потенцијала, као мере колоидне стабилности, нативних и агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса;
- Поређење резултата мерења величине колоидних честица у препаратима нативних и агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса фотон корелационом спектроскопијом са величином колоидних честица у препаратима нативног и агрегираног хуманог албумина као модела глобуларног протеина.

Б) Анализа величине колоидних честица у CIC здравих особа

- Изоловање CIC здравих особа преципитацијом полиетилен гликолом и анализа садржаја класа и подкласа имуноглобулина у изолованим CIC;
- Анализа CIC здравих особа ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и скенирајућом електронском микроскопијом (енглески: *scanning electron microscopy*; SEM);
- Мерење величине колоидних честица у CIC здравих особа фотон корелационом спектроскопијом и одабир оптималне методе анализе (*cumulant* и/или *corenn* и/или *contin*) на основу поређења/корелирања са резултатима ултрацентрифугирања, гел филтрације и SEM нативних и агрегираних IgG;
- Дефинисање вредности ζ (електрокинетичког) потенцијала CIC здравих особа.

В) Анализа величине коидних честица у CIC особа са реуматоидним артритисом (РА) као модел болести посредоване имунокомплексима.

- Изоловање CIC из серума особа са РА преципитацијом полиетилен гликолом и анализа садржаја класа и подкласа имуноглобулина у изолованим CIC;

- Анализа СИС из серума особа са РА ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и сканирајућом електронском микроскопијом (енглески: *scanning electron microscopy*; SEM);
- Мерење величине колоидних честица у СИС изолованим из серума особа са РА фотон кореалционом спектроскопијом и одабир анализе (*cumulant* и/или *corenn* и/или *contin*) на основу поређења/корелирања са резултатима ултрацентрифугирања, гел филтрације и SEM нативних и агрегираних IgG;
- Дефинисање вредности ζ (електрокинетичког) потенцијала СИС серума особа са РА.

Списак стручне литературе која ће се користити:

Benita S, Levy MY. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J Pharm Sci.* 1993 Nov;82(11):1069-79. doi: 10.1002/jps.2600821102. PMID: 8289116.

Bhirde A, Chikkaveeraiah BV, Venna R, Carley R, Brorson K, Agarabi C. High Performance Size Exclusion Chromatography and High-Throughput Dynamic Light Scattering as Orthogonal Methods to Screen for Aggregation and Stability of Monoclonal Antibody Drug Products. *J Pharm Sci.* 2020 Nov;109(11):3330-3339. doi: 10.1016/j.xphs.2020.08.013. Epub 2020 Aug 21. PMID: 32835703.

Dayer E, Gerster JC, Aguado MT, Lambert PH. Capacity to solubilize immune complexes in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1983 Feb;26(2):156-64. doi: 10.1002/art.1780260206. PMID: 6824512.

den Engelsman J, Kebbel F, Garidel P. Laser Light Scattering-Based Techniques Used for the Characterization of Protein (Chapter 3). In: Mahler H-C, Jiskoot W (Eds). *Analysis of aggregates and particles in protein pharmaceuticals*. Jon Wiley & Sons, Inc. 2012:page 37.

Demidova, M.G., Bulavchenko, A.I., Antonova, O.V. *et al.* Photon correlation spectroscopy and the luminescence of stabilized silver nanoparticles in heptane. *Russ. J. Phys. Chem.* 89, 674–679 (2015). doi.org/10.1134/S0036024415040068

Deverill I, Lock RJ. Kinetics of the antigen:antibody reaction. Light scattering and particle size measurement using photon correlation spectroscopy. *Ann Clin Biochem.* 1983 Jul;20 (Pt 4):224-6. doi: 10.1177/000456328302000407. PMID: 6614820.

Easterbrook-Smith SB. A light-scattering method for measuring the sizes of insoluble immune complexes. *Mol Immunol.* 1993 May;30(7):637-40. doi: 10.1016/0161-5890(93)90074-I. PMID: 8487780.

Fávero-Retto MP, Palmieri LC, Souza TA, Almeida FC, Lima LM. Structural meta-analysis of regular human insulin in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013 Nov;85(3 Pt B):1112-21. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.05.005. Epub 2013 May 18. PMID: 23692694.

Georgieva D, Koker M, Redecke L, Perbandt M, Clos J, Bredehorst R, Genov N, Betzel C Oligomerization of the proteolytic products is an intrinsic property of prion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 323:1278–1286.

Greinacher A, Selleng K, Palankar R, et al. Insights in ChAdOx1 nCoV-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Blood.* 2021 Dec 2;138(22):2256-2268. doi: 10.1182/blood.2021013231. PMID: 34587242; PMCID: PMC8483989.

György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood.* 2011 Jan 27;117(4):e39-48. doi: 10.1182/blood-2010-09-307595. Epub 2010 Nov 1. PMID: 21041717.

- Hexley P, Robinson CT, Osterburg AR, Babcock GF. Circulating microparticles do not all share biophysical light scatter properties with immune complexes when analyzed by flow cytometry. *Blood*. 2012 Aug 16;120(7):1528-9. doi: 10.1182/blood-2012-03-413583. PMID: 22899476.
- Hörl G, Froehlich H, Ferstl U, Ledinski G, Binder J, Cvirn G, Stojakovic T, Trauner M, Koidl C, Tafeit E, Amrein K, Scharnagl H, Jürgens G, Hallström S. Simvastatin Efficiently Lowers Small LDL-IgG Immune Complex Levels: A Therapeutic Quality beyond the Lipid-Lowering Effect. *PLoS One*. 2016 Feb 3;11(2):e0148210. doi: 10.1371/journal.pone.0148210. PMID: 26840480; PMCID: PMC4739583.
- Jones VE, Orlans E. Isolation of immune complexes and characterisation of their constituent antigens and antibodies in some human diseases: a review. *J Immunol Methods*. 1981;44(3):249-70. doi: 10.1016/0022-1759(81)90045-4. PMID: 6168704.
- Jøssang T, Feder J, Rosenqvist E. Photon correlation spectroscopy of human IgG. *J Protein Chem*. 1988 Apr;7(2):165-71. doi: 10.1007/BF01025246. PMID: 3255367.
- Khlebtsov BN, Burygin GL, Matora LY, Shchyogolev SY, Khlebtsov NG. A method for studying insoluble immune complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Feb 24;1670(3):199-207. doi: 10.1016/j.bbagen.2003.12.005. PMID: 14980446.
- Landa SB, Korabliov PV, Semenova EV, Filatov MV. Peculiarities of the formation and subsequent removal of the circulating immune complexes from the bloodstream during the process of digestion. *F1000Res*. 2018 May 21;7:618. doi: 10.12688/f1000research.14406.1. PMID: 30079242; PMCID: PMC6058468.
- Lin T, Zhao P, Jiang Y, Tang Y, Jin H, Pan Z, He H, Yang VC, Huang Y. Blood-Brain-Barrier-Penetrating Albumin Nanoparticles for Biomimetic Drug Delivery via Albumin-Binding Protein Pathways for Antiglioma Therapy. *ACS Nano*. 2016 Nov 22;10(11):9999-10012. doi: 10.1021/acsnano.6b04268. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27934069.
- Loske AM, Tello EM, Vargas S, Rodriguez R. Escherichia coli viability determination using dynamic light scattering: a comparison with standard methods. *Arch Microbiol*. 2014 Aug;196(8):557-63. doi: 10.1007/s00203-014-0995-x. Epub 2014 May 23. PMID: 24853284.
- Lux A, Yu X, Scanlan CN, Nimmerjahn F. Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcγRs. *J Immunol*. 2013 Apr 15;190(8):4315-23. doi: 10.4049/jimmunol.1200501. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23509345.
- Mageed RA, Kirwan JR, Thompson PW, McCarthy DA, Holborow EJ. Characterisation of the size and composition of circulating immune complexes in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1991 Apr;50(4):231-6. doi: 10.1136/ard.50.4.231. PMID: 2029205; PMCID: PMC1004392.
- Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci*. 2009 Sep;98(9):2909-34. doi: 10.1002/jps.21566. PMID: 18823031.
- Malvern Panalytical .The Determination of Protein Structure and Stability by Combining Dynamic Light ScaHering and Raman Spectroscopy 2014. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=11169>.
- Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Apr 25;47(2-3):165-96. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00105-3. PMID: 11311991.
- Meyer A, Dierks K, Hilterhaus D, Klupsch T, Mühlig P, Kleesiek J, Schöpflin R, Einspahr H, Hilgenfeld R, Betzel C. Single-drop optimization of protein crystallization. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2012 Aug 1;68(Pt 8):994-8. doi: 10.1107/S1744309112024074. Epub 2012 Jul 31. PMID: 22869140; PMCID: PMC3412791.
- Murphy RM, Slayter H, Schurtenberger P, Chamberlin RA, Colton CK, Yarmush ML. Size and structure of antigen-antibody complexes. Electron microscopy and light scattering studies. *Biophys J*. 1988 Jul;54(1):45-56. doi: 10.1016/S0006-3495(88)82929-1. PMID: 3416033; PMCID: PMC1330314.
- Kossovsky N., K. Liao, A. Gelman, P. Campbell, H. Amstutz, G. Finerman, S. Nasser, and B. Thomas, Photon Correlation Spectroscopy Analysis of the Submicrometre Particulate Fraction in Human Synovial Tissues Recovered at Arthroplasty or Revision, in Particulate Debris from Medical Implants: Mechanisms of

Formation and Biological Consequences, ed. K.J. St. (West Conshohocken, PA: ASTM International, 1992), 68-74.doi:10.1520/STP14853S.

Nobbsmann U, Connah M, Fish B, Varley P, Gee C, Mulot S, Chen J, Zhou L, Lu Y, Shen F, Yi J, Harding SE. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2007;24:117-28. doi: 10.1080/02648725.2007.10648095. PMID: 18059629.

Nezlin R. Circulating non-immune IgG complexes in health and disease. *Immunol Lett.* 2009 Feb 21;122(2):141-4. doi: 10.1016/j.imlet.2009.01.003. Epub 2009 Feb 2. PMID: 19189847.

Oberthuer D, Melero-García E, Dierks K, Meyer A, Betzel C, Garcia-Caballero A, Gavira JA. Monitoring and scoring counter-diffusion protein crystallization experiments in capillaries by in situ dynamic light scattering. *PLoS One.* 2012;7(6):e33545. doi: 10.1371/journal.pone.0033545. Epub 2012 Jun 4. PMID: 22675464; PMCID: PMC3366972.

Sontum PC, Christiansen C. Photon correlation spectroscopy applied to characterisation of denaturation and thermal stability of human albumin. *J Pharm Biomed Anal.* 1997 Oct;16(2):295-302. doi: 10.1016/s0731-7085(97)00032-0. PMID: 9408847.

Pavlović, N. V., Jovanović, J. R., Đorđević, V. B., Balanč, B. D., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. Priprema i karakterizacija lipozoma sa inkapsuliranim bioaktivnim hidrolizatom proteina soje. *Chemical Industry/Hemijaska Industrija*, 2020;74(5). [doi:10.2298/HEMIND200530030P](https://doi.org/10.2298/HEMIND200530030P)

Petrache AI, Machin DC, Williamson DJ, Webb ME, Beales PA. Sortase-mediated labelling of lipid nanodiscs for cellular tracing. *Mol Biosyst.* 2016 May 24;12(6):1760-3. doi: 10.1039/c6mb00126b. PMID: 27075883. Poulton TA, Mooney NA, Nineham LJ, Hay FC. Characteristics of immune complexes detectable by two independent assays in gynaecological malignancies. *Clin Exp Immunol.* 1983 Sep;53(3):573-80. PMID: 6604605; PMCID: PMC1535663.

Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicol.* 2014 Apr-Jun;11(2):99-109. doi: 10.3109/1547691X.2013.821564. Epub 2013 Aug 6. PMID: 23919460; PMCID: PMC4002659.

Redecke L, Binder S, Elmallah MI, Broadbent R, Tilkorn C, Schulz B, May P, Goos A, Eich A, Rübhausen M, Betzel C. UV-light-induced conversion and aggregation of prion proteins. *Free Radic Biol Med.* 2009 May 15;46(10):1353-61. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.013. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19249347.

Rojko JL, Evans MG, Price SA, Han B, Waine G, DeWitte M, Haynes J, Freimark B, Martin P, Raymond JT, Evering W, Rebelatto MC, Schenck E, Horvath C. Formation, clearance, deposition, pathogenicity, and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: review and case studies. *Toxicol Pathol.* 2014 Jun;42(4):725-64. doi: 10.1177/0192623314526475. Epub 2014 Apr 3. PMID: 24705884.

Schubert R, Meyer A, Baitan D, Dierks K, Perbandt M, Betzel C. Real-time observation of protein dense liquid cluster evolution during nucleation in protein crystallization. *Cryst Growth Des.* 2017; 17:954–958.doi: 10.1021/acs.cgd.6b01826.

Starshinova A, Zinchenko Y, Filatov M, Denisova N, Istomina E, Landa S, Burdakov V, Churilov L, Sapozhnikova N, Pavlova M, Stepanenko T, Mayevskaya V, Yablonskiy P. Specific features of immune complexes in patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Immunol Res.* 2018 Dec;66(6):737-743. doi: 10.1007/s12026-018-9052-1. PMID: 30552618.

Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* 2016 Dec;8(4):409-427. doi: 10.1007/s12551-016-0218-6. Epub 2016 Oct 6. PMID: 28510011; PMCID: PMC5425802.

Stieh DJ, King DF, Klein K, Liu P, Shen X, Hwang KK, Ferrari G, Montefiori DC, Haynes B, Pitisuttithum P, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Rerks-Ngarm S, Michael NL, Robb ML, Kim JH, Denny TN, Tomaras GD, Shattock RJ. Aggregate complexes of HIV-1 induced by multimeric antibodies. *Retrovirology.* 2014 Oct 2;11:78. doi: 10.1186/s12977-014-0078-8. PMID: 25274446; PMCID: PMC4193994.

Taatjes DJ, Bouffard N, von Turkovich M, Quinn AS, Wu XX, Vasovic LV, Rand JH. Visualization of macro-immune complexes in the antiphospholipid syndrome by multi-modal microscopy imaging. *Micron*. 2017 Sep;100:23-29. doi: 10.1016/j.micron.2017.04.005. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28463750.

Thode K, Müller RH, Kresse M. Two-time window and multiangle photon correlation spectroscopy size and zeta potential analysis--highly sensitive rapid assay for dispersion stability. *J Pharm Sci*. 2000 Oct;89(10):1317-24. doi: 10.1002/1520-6017(200010)89:10<1317::aid-jps9>3.0.co;2-g. PMID: 10980506.

van Schie KA, Kruithof S, Ooijevaar-de Heer P, Derksen NIL, van de Bovenkamp FS, Saris A, Vidarsson G, Bentlage AEH, Jiskoot W, Romeijn S, Koning RI, Bos E, Stork EM, Koeleman CAM, Wuhler M, Wolbink G, Rispens T. Restricted immune activation and internalisation of anti-idiotypic complexes between drug and antidrug antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2018 Oct;77(10):1471-1479. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213299. Epub 2018 Jun 26. PMID: 29945923.

Virella G, Kilpatrick JM, Chenais F, Fudenberg HH. Isolation of soluble immune complexes from human serum: combined use of polyethylene glycol precipitation, gel filtration, and affinity chromatography on protein A-Sepharose. *Methods Enzymol*. 1981;74 Pt C:644-63. doi: 10.1016/0076-6879(81)74045-x. PMID: 7321899.

van Schie KA, Kruithof S, Ooijevaar-de Heer P, Derksen NIL, van de Bovenkamp FS, Saris A, Vidarsson G, Bentlage AEH, Jiskoot W, Romeijn S, Koning RI, Bos E, Stork EM, Koeleman CAM, Wuhler M, Wolbink G, Rispens T. Restricted immune activation and internalisation of anti-idiotypic complexes between drug and antidrug antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2018 Oct;77(10):1471-1479. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213299. Epub 2018 Jun 26. PMID: 29945923.

Warren JS, & Ward PA. Immune complex diseases, 2017;eLS, 1-9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002164.pub3>.

Williams JC, Mackman N. MPs or ICs? *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1101-2. doi: 10.1182/blood-2010-11-318691. PMID: 21273325.

Wolfram Eberstein, Yannis Georgalis, Wolfram Saenger, Molecular interactions in crystallizing lysozyme solutions studied by photon correlation spectroscopy, *Journal of Crystal Growth*, Volume 143, Issues 1-2, 1994, Pages 71-78, [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(94\)90369-7](https://doi.org/10.1016/0022-0248(94)90369-7).

3. Полазне хипотезе

Истраживања предложена у оквиру ове докторске дисертације полазе од хипотезе да је фотон корелационом спектроскопијом могуће анализирати величину имунокомплекса у физиолошким и патолошким стањима људи и да се на тај начин она може користити у дијагностичке сврхе.

При томе се полази од следећих претпоставки:

- Могуће је изоловати хумане IgG из периферне крви здравих особа и формирати *in vitro* аналоге имунокомплекса агрегирањем нативних IgG топлотом, као и да је могуће *in vitro* формирати имунокомплексе између IgG и моноклонских антитела миша специфичних за к лаке ланце имуноглобулина и одредити њихову величину „стандардним“ методама: ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и сканирајућом електронском микроскопијом (енглески: *scanning electron microscopy*; SEM);
- Фотон корелационом спектроскопијом се такође може одредити величина колодних честица у препаратима нативних и агрегираних IgG и дефинисати

вредности ζ (электрокинетичког) потенцијала, као мере колоидне стабилности, нативних и агрегираних IgG;

- Одабиром оптималне методе анализе (*cumulant* и/или *corenn* и/или *contin*) и на основу поређења/корелирања са резултатима „стандардних“ метода анализе величине и структуре нативних и агрегираних IgG и њихим поређењем са величином колоидних честица у препаратима нативног и агрегiranог хуманог албумина (као модела глобуларног протеина) можемо добити оптималан начин обраде података како би се добили резултати у складу са структуром нативних и агрегираних IgG;
- CIC здравих особа и CIC особа са РА се могу изоловати преципитацијом полиетилен гликолом, а величина изолованих имунокомплекса се може одредити „стандардним“ методама: ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и скенирајућом електронском микроскопијом (енглески: *scanning electron microscopy*; SEM);
- Мерењем величине колоидних честица у CIC здравих особа и CIC особа са РА фотон корелационом спектроскопијом и одабиром оптималне методе анализе (*cumulant* и/или *corenn* и/или *contin*) на основу поређења/корелирања са резултатима „стандардних“ метода могуће је формирати референтни систем дистрибуције величине циркулишућих имунокомплекса у физиолошким и патолошким стањима људи и на тај начин показати потенцијалну примену фотон корелационе спектроскопије у дијагностичке сврхе реуматоидног артритиса, али и у другим инфективним и инфламаторним/аутоимуним болестима.

4. Научне методе истраживања

У овој дисертацији као биолошки материјал користиће се серуми периферне крви здравих особа, добровољних давалаца крви који дају крв у Институту за трансфузиологију и хемобиологију Војномедицинске академије у Београду, серуми периферне крви особа са РА који се лече у Институту за реуматологију у Београду и комерцијални препарат 20% хуманог албумина за интравенску примену.

Због велике хетерогености молекула, за потребе анализе нативних и агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса, IgG ће бити изоловани из збирног узорка (енглески: *pool*) 100 серума здравих особа. За потребе изоловања ових молекула користиће се стандардне методе за изоловање и пречишћавање молекула имуноглобулина: преципитационе технике (преципитација амонијум сулфатом, риванолом итд.) у комбинацији са јоноизмењивачком и/или афинитетном хроматографијом. Идентификација и анализа степена пречишћености IgG молекула ће се испитивати техникама електрофорезе протеина и вестерн и дот блотом. Квантификација IgG ће бити рађена нефелометријски и методом ELISA (енглески: *enzyme-linked immunoassay*). Изоловани IgG (из збирних узорака серума здравих људи) ће бити агрегирани топлотом, стандардним поступком (10 min, на 63° C). Ефикасност денатурације и агрегације ће бити процењене на основу мерења апсорбације на 280 nm и 350 nm. Изоловани IgG (из збирних узорака серума здравих људи) на протеину Г биће

спојен у различитим односима са моноклонским антителом миша специфичног за к лаке ланце имуноглобулина. CIC из серума здравих особа и особа са РА ће бити изоловани преципитацијом полиетилен гликолом (енглески: *polyethylene glycol*; PEG). Ниво имунокомплекса ће бити одређен мерењем апсорбације на 350 nm. Састав имуноглобулина у изолованим CIC ће бити анализиран имунохемијским методама (ELISA, вестерн и дот блот). Величина колоидних честица нативних IgG, и честица у саставу агрегираних IgG, *in vitro* формираних имунокомплекса и CIC здравих особа и особа са РА, као и величина колоидних честица у препарату нативног албумина и агрегатима албумина добијених загревањем ће бити анализирана: гел филтрацијом, ултрацентрифугирањем на градијенту сахарозе, скенирајућом електронском микроскопијом, фотон корелационом спектроскопијом. Просечна величина честица применом фотон корелационе спектроскопије одредиће се коришћењем уређаја Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments*, Велика Британија), повезаним са софтверским пакетом *Zetasizer software* верзија 7.03. Мерни опсег инструмента је од 0,6 nm до 6 μ m. Мерења ће бити рађена на температури од 25°C, при углу расипања од 173°, и уз примену начина мерења означеног као *automatic sampling time mode*. ζ потенцијал нативних IgG, IgG агрегираних топлотом, *in vitro* формираних имунокомплекса, CIC здравих особа и CIC особа са РА ће се такође мерити на апарату Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments*, Велика Британија).

Математичка обрада резултата добијених фотон корелационом спектроскопијом, која ће се урадити применом одговарајућих софтверских пакета ће омогућити да се:

1. Величина агрегираних честица у препаратима агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса изрази као умножак величине (тј. хидродинамичког пречника) нативних IgG, односно основне структурне јединице молекула имуноглобулина;
2. Направи систем референтних вредности за дистрибуцију величине (хидродинамичког пречника) колоидних честица у CIC крви здравих особа;
3. Одреди вредности дистрибуције величине (хидродинамичког пречника) колоидних честица у CIC особа са РА;
4. Статистичким методама испита значајност разлике у дистрибуцији величине (хидродинамичког пречника) колоидних честица CIC здравих особа и CIC особа са РА).

5. Очекивани научни допринос

Као резултат рада на овој тези:

- Биће дефинисан оптималан поступак изоловања CIC особа са РА и здравих особа и ниво изолованих CIC;
- Биће дефинисан имуноглобулински састав CIC особа са РА и здравих особа и на основу њега ће бити процењени њихови биолошки ефекти;
- Биће урађена биофизичка карактеризација CIC особа са РА и здравих особа применом стандардних аналитичких метода ултрацентрифугирања, гел филтрације

и SEM и на основу добијених резултата ће се проценити величина и геометрија CIC као и њихови биолошки ефекти;

- Биће стандардизована метода фотон корелационе спектроскопије за анализу величине колоидних честица у саставу CIC. Ова стандардизација подразумева одабир оптималне математичке анализе резултата мерења методом фотон корелационе спектроскопије која ће дати резултате у складу са резултатима стандардних метода које се примењују за биофизичку, биохемијску и имунохемијску карактеризацију CIC;
- Биће дефинисан систем референтних вредности расподеле величине колоидних честица у CIC здравих особа и на основу њега ће бити дефинисана промена величине колоидних честица у саставу CIC особа са РА;
- Биће дефинисане вредности ζ (електрокинетичког) потенцијала CIC здравих особа и на основу њих ће бити дефинисана промена ζ потенцијала, тј. промена колоидне стабилности CIC у РА.

На основу укупних резултата добијених у овој тези:

- Биће успостављен нови приступ за успостављање ране дијагнозе РА, али и других болести посредованих имунокомплексима, као и за праћење прогресије ових болести и олакшано тестирање ефикасности различитих протокола лечења заснованих на класичним лековима или биотерапеутицима.
- Отвориће се могућност да фотон корелационе спектроскопија постане поуздан метод за праћење ефеката физиолошких процеса (старење, разних типова физичке активности) или изложености различитим физичким, хемијским и биолошким факторима средине на карактеристике имунокомплекса на основу чега би се процењивала њихова улога на функционисање хуморалне гране, али и имунског одговора у целини.

6. План истраживања и структура дисертације

Истраживања у овој докторској дисертацији су планирана по следећим фазама:

1. Анализа нативних IgG, агрегираних IgG (*in vitro* аналога имунокомплекса) и *in vitro* формираних имунокомплекса

- 1.1. Одабир оптималних метода и дефинисање протокола експерименталног рада и метода анализе, на основу података доспних у научној литератури.
- 1.2. Изоловање IgG из периферне крви здравих особа
- 1.3. Формирање *in vitro* аналога имунокомплекса агрецијом IgG топлотом
- 1.4. *In vitro* формирање имунокомплекса између IgG и моноклонских антитела миша специфичних за к лаке ланце имуноглобулина.
- 1.5. Анализа величине нативних и агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса:
 - ултрацентрифугирањем,
 - гел филтрацијом,
 - SEM.

- 1.6. Мерење величине колоидних честица у препаратима нативних и агрегираних IgG фотон корелационом спектроскопијом.
- 1.7. Мерење величине колоидних честица у препаратима нативног и агрегираног хуманог албумина фотон корелационом спектроскопијом.
- 1.8. Дефинисање вредности ζ (електрокинетичког) потенцијала, као мере колоидне стабилности, нативних и агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса;
- 1.9. Математичка обрада података: изражавање величине агрегираних честица у препаратима агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса као умножак величине нативних IgG.

2. Анализа величине колоидних честица у СИС здравих особа

- 2.1. Одабир оптималних метода, дефинисање протокола експерименталног рада и метода анализе на основу података доспних у научној литератури и резултата добијених у првој фази рада ове дисертације.
- 2.2. Одабир испитаника, здравих особа и дефинисање група испитаника на основу пола и старости
- 2.3. Изоловање СИС здравих особа и анализа имуноглобулинског састава;
- 2.4. Анализа величине СИС здравих особа:
 - ултрацентрифугирањем,
 - гел филтрацијом,
 - SEM.
- 2.5. Мерење величине колоидних честица у СИС здравих особа фотон корелационом спектроскопијом.
- 2.6. Дефинисање вредности ζ (електрокинетичког) СИС здравих особа.
- 2.7. Математичка обрада података: Дефинисање система референтних вредности за дистрибуцију величине колоидних честица у СИС крви здравих особа

3. Анализа величине колоидних честица СИС особа са РА

- 3.1. Одабир оптималних метода, дефинисање протокола експерименталног рада и метода анализе на основу података доспних у научној литератури и резултата добијених у првој две фазе израде ове дисертације.
 - 3.2. Одабир испитаника, особа са РА, и дефинисање група испитаника на основу пола, старости и клиничке слике
 - 3.3. Изоловање СИС особа са РА преципитацијом полиетилен гликолом и дефинисање имуноглобулинског састава у изолованим СИС;
 - 3.4. Анализа величине СИС здравих особа:
 - ултрацентрифугирањем,
 - гел филтрацијом,
 - SEM.
 - 3.5. Мерење величине колоидних честица у СИС особа са РА фотон корелационом спектроскопијом.
 - 3.6. Дефинисање вредности ζ (електрокинетичког) потенцијала СИС особа са РА.
- Математичка обрада података: Дефинисање вредности дистрибуције величине (хидродинамичког пречника) колоидних честица у СИС особа са РА и испитивање

значајност разлике у дистрибуцији величине колоидних честица СИС здравих особа и СИС особа са РА.

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

У поглављу *Увод* биће дефинисани предмет истраживања и главни циљеви дисертације. У оквиру *Теоријског дела* докторске дисертације биће дат преглед теоретских основа фотон корелационе спектроскопије као и њене примене у различитим областима биомедицинских истраживања, као и структура, својства и улога циркулишућих имунокомплекса у организму. Детаљним прегледом литературе биће сумирана досадашња истраживања из области примене фотон корелационе спектроскопије за мерење величине имунокомплекса у болестима посредованим имунокомплексима, пре свега реуматоидном артритису. У оквиру *Експерименталног дела* биће описани поступци и методе *in vitro* добијања имунокомплекса и одређивање њихове величине, као и поступци и методе за изоловање и одређивање величине *in vivo* формираних имунокомплекса из серума здравих особа и особа са РА. У поглављу *Резултати и дискусија*, биће приказани и анализирани резултати експерименталних истраживања, поређени са досадашњим подацима у литератури уз анализу применљивости добијених резултата за дијагностичке сврхе. У *Закључку* ће резултати добијени у току истраживања бити сумирани уз наглашавање њихових научних доприноса. *Литература* ће садржати наводе цитиране у раду и публикације проистекле из истраживачког рада ове докторске тезе.

7. Закључак и предлог

На основу наведених података, Комисија сматра да је предложена тема докторске дисертације **Тамаре Ђукић, магистра фармације**, под насловом: „**Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе**“ научно заснована и да представља значајан допринос припадајућој научној области. 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.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидаткињи Тамари Ђукић одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом. За менторе се предлажу др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду и др Весна Илић, научни саветник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду, Институт од националног значаја за Републику Србију.

У Београду,
21. децембра 2022.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Весна Илић, научни саветник
Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања
Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Верица Ђорђевић, научни саветник
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Ивана Дрвеница, виши научни сарадник
Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања
Институт од националног значаја за Републику Србију