

Факултет Технолошко-металуршки

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/323

(Број захтева)

27. 12. 2024.

(Датум)

Веће научних области техничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев упућује)

## ЗАХТЕВ

## за давање сагласности на одлуке о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и о именовању комисије за одбрану

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

КАНДИДАТ Тамара (Небојша) Ђукић

(име, име једног од родитеља и презиме)

студент докторских студија на студијском програму : Биохемијско инжењерство и биотехнологија

пријавио је докторску дисертацију под називом:

**Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе**из научне области: Технолошко инжењерство

Универзитет је дана 23.1. 2023. својим актом под бр. 61206-173/2-23 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

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

Име и презиме ментора: др Верица Ђорђевић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Весна Илић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Института од националног значаја за Републику Србију.

Комисија за оцену докторске дисертације именована је на седници одржаној 19. 9. 2024. одлуком факултета под бр. 35/257, у саставу:

|    | Име и презиме члана комисије | звање                | научна област                            | Установа у којој је запослен       |
|----|------------------------------|----------------------|------------------------------------------|------------------------------------|
| 1. | Др Зорица Кнежевић - Југовић | редовни професор     | Биохемијско инжењерство и биотехнологија | ТМФ                                |
| 2. | Др Соња Јаковетић Танасковић | доцент               | Биохемијско инжењерство и биотехнологија | ТМФ                                |
| 3. | Др Ивана Дрвеница            | виши научни сарадник | Фармацеутска технологија                 | Институт за медицинска истраживања |
| 4. | Др Маријана Ковачић          | научни сарадник      | Имунологија                              | Институт за медицинска истраживања |

Датум стављања извештаја Комисије и докторске дисертације на увид јавности 18.10. 2024.

Наставно-научно веће факултета усвојило је извештај Комисије за оцену докторске дисертације на седници одржаној дана 26. 12. 2024.

**Комисија за одбрану докторске дисертације** именована је на седници одржаној **26. 12. 2024.**

одлуком факултета под бр. 35/325, у саставу:

|    | Име и презиме члана<br>комисије | звање                | научна област                               | Установа у којој<br>је запослен       |
|----|---------------------------------|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. | Др Зорица Кнежевић - Југовић    | редовни професор     | Биохемијско инжењерство<br>и биотехнологија | ТМФ                                   |
| 2. | Др Соња Јаковетић Танасковић    | доцент               | Биохемијско инжењерство<br>и биотехнологија | ТМФ                                   |
| 3. | Др Ивана Дрвеница               | виши научни сарадник | Фармацеутска<br>технологија                 | Институт за медицинска<br>истраживања |
| 4. | Др Маријана Ковачић             | научни сарадник      | Имунологија                                 | Институт за медицинска<br>истраживања |

**Напомена:** уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Студент је уписан на докторске студије школске 2019/2020. године.

---

**ДЕКАНКА ФАКУЛТЕТА**

**др Мирјана Кијевчанин, редовни професор**

- 
- Прилози:**
1. Одлука Наставно-научног већа о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и одлука о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације
  2. Извештај Комисије о оцени докторске дисертације
  3. Примедбе на извештај Комисије о оцени докторске дисертације (уколико их је било) и мишљење Комисије о примедбама

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

ДIIVa

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. 41. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 26. 12. 2024. године, донета је

## О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Соња Јаковетић Танасковић, доцент 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 и др Маријана Ковачић, научни сарадник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања, Институт од националног значаја за Републику Србију о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: **„Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“** коју је поднела **Тамара Ђукић**, магистар фармације и упућује се на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације **Тамаре Ђукић**, под називом **„Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“** Одлуком број: 61206-173/2-23 од 23. 1. 2023. године.

Верификација научних доприноса:

### Категорија M21:

1.**Ђукић Т**, Drvenica I, Kovačić M, Milanović S, Majerič D, Šefik-Bukilica M, Miletic M, Bugarski B, Ilić V. Exploring the Link between Hydrodynamic Size and Immunoglobulins of Circulating Immune Complexes in Rheumatoid Arthritis Patients. International Journal of Molecular Sciences. 2024, 25(6), 3138. IF(2023)=4,9, ISSN: 1422-0067, <https://doi.org/10.3390/ijms25063138>.

### Категорија M22:

2.**Ђукић Т**, Drvenica I, Kovačić M, Minić R, Vučetić D, Majerič D, Šefik-Bukilica M, Savić O, Bugarski B, Ilić V. Dynamic Light Scattering Analysis of Immune Complexes in Sera of Rheumatoid Arthritis Patients. Analytical Biochemistry 2023, 674, 115194. IF(2022)=2,9, ISSN 0003-2697, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115194>.

Одлуку доставити: Већу научних области техничких наука Универзитета, менторима, Служби за наставно-студентске послове и Архиви факултета.

Д Е К А Н К А

Проф. др Мирјана Кијевчанин

ДV

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. 41. и 42. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 26. 12. 2024. године, донета је

### О Д Л У К А

о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације

Именује се Комисија за одбрану докторске дисертације **Тамаре Ђукић**, магистра фармације, са темом под називом „Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“, у саставу:

1. Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет,
2. Др Соња Јаковетић Танасковић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет,
3. Др Ивана Дрвеница, виши научни сарадник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања, Институт од националног значаја за Републику Србију,
4. Др Маријана Ковачић, научни сарадник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања, Институт од националног значаја за Републику Србију.

Одлуку доставити: Одлуку доставити: члановима Комисије, Универзитету у Београду, Служби за наставно-студентске послове и Архиви Факултета.

Д Е К А Н К А

Проф. др Мирјана Кијевчанин

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Технолошко-металуршки факултет

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

**Предмет:** Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Тамаре Н. Ђукић

Одлуком 35/257 бр. од 19. септембра 2024. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену докторске дисертације кандидата **Тамаре Н. Ђукић** под насловом

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

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

## РЕФЕРАТ

### 1. УВОД

#### 1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

Кандидат Тамара Н. Ђукић, магистар фармације, уписала је докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија, школске 2019/2020.

**8. новембра 2022.** – Кандидат Тамара Н. Ђукић предложила је тему докторске дисертације под називом: „Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“.

**22. новембра 2022.** – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду донета је Одлука бр. 35/271 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Тамаре Н. Ђукић за израду докторске дисертације под називом: „Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“.

**29. децембра 2022.** – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду донета је Одлука бр. 35/338 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобравању израде докторске дисертације Тамаре Н. Ђукић, под називом: „Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“, а за менторе поменуте докторске дисертације именовани су проф. др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршког факултета и др Весна Илић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Института од националног значаја за Републику Србију.

**23. јануара 2023.** – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду, Одлуком бр. 61206-173/2-23 дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Тамаре Н. Ђукић, под називом: „Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“.

**30. маја 2024.** – На молбу докторанда, Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, донело је Одлуку бр. 35/134 о промени ментора проф. др Бранка Бугарског, услед његовог одласка у пензију. За ментора је именована др Верица Ђорђевић, доцент Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, уз сагласност др Бранка Бугарског, др Весне Илић и др Верице Ђорђевић. Др Весна Илић, која је претходно именована за другог ментора је задржала менторство.

**17. јуна 2024.** – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на Одлуку Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду о промени ментора проф. др Бранка Бугарског и именовању ментора доц. др Верице Ђорђевић.

**19. септембра 2024.** – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду донета је Одлука бр. 35/257 о именовању Комисије за оцену докторске дисертације Тамаре Н. Ђукић, под називом: „Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“, у саставу: др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор, Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, др Соња Јаковетић Танасковић, доцент Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, др Ивана Дрвеница, виши научни сарадник, Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Института од националног значаја за Републику Србију и др Маријана Ковачић, научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Института од националног значаја за Републику Србију.

## 1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство и ужој научној области Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за које је матичан Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. Ментори, др Верица Ђорђевић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршког факултета и др Весна Илић, научни саветник Универзитета у Београду, Института за медицинска истраживања, Института од националног значаја за Републику Србију су на основу дугогодишњег учешћа у наставно-научном процесу, као и на основу остварених научних и стручних публикација у потпуности компетентни да руководе израдом докторске дисертације кандидата Тамаре Н. Ђукић, магистра фармације и студента докторских академских студија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

### 1.3. Биографски подаци о кандидату

Тамара Н. Ђукић, магистар фармације, рођена је 27. јуна 1994. године у Крушевцу. Основну и средњу школу завршила је у Варварину са одличним успехом. Интегрисане академске студије фармације завршила је 2018. године, са просечном оценом 9,23 на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Додатно, 2022. године завршила је мастер студије на Факултету инжењерских наука Универзитета у Крагујевцу, смер Бионжењеринг, са просечном оценом 9,86 и тиме стекла звање мастер инжењер биомедицинског инжењеринга.

Докторске академске студије је уписала школске 2019/2020. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Од августа 2020. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду као истраживач приправник, док је у мају 2023. године стекла звање истраживач сарадник.

Ангажована је на пројекту *MultiPromis - Multifunctional leaf protein and assembled nanopcarrier structures delivered by enzyme technology* (евиденциони број 7751519 од 2022. до 2025. године) којим руководи проф. др Зорица Кнежевић-Југовић у оквиру програма „Идеје“ Фонда за науку Републике Србије. Учесник је и COST акције CA21160 *Non-globular proteins in the era of Machine Learning (ML4NGP, 2022-2026.године)*, од 2023. године.

Тамара Н. Ђукић је била учесник Еразмус+ програма мобилности у трајању од три месеца (јун-септембар 2021.) на Пољопривредном факултету Универзитета у Атини (*Agricultural University of Athens, Greece*) у лабораторији за хемију (*Department of Food Science and Human Nutrition*).

Као резултат досадашњег рада, као аутор или коаутор, објавила је један рад у врхунском међународном часопису (M21), један рад у истакнутом међународном часопису (M22), један рад у међународном часопису (M23), као и 9 радова саопштених на домаћим и међународним скуповима штампаних у изводу.

## 2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

### 2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Тамаре Н. Ђукић, магистра фармације, садржи 115 страна (од којих је 99 страна нумерисано), у оквиру којих се налази 8 поглавља, 46 слика, 8 табела и 196 литературна навода. Докторска дисертација садржи: Увод, Теоријски део, Циљ, Експериментални део, Резултате и дискусију, Закључак, Литературу и Прилоге. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском језику. По свом облику и садржају, поднети рад задовољава све стандарде за докторску дисертацију Универзитета у Београду.

### 2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У оквиру Увода дефинисан је предмет истраживања, са посебним освртом на фотон корелациону спектроскопију, као широко коришћену технику у истраживањима у оквиру природних, биомедицинских наука, науке о материјалима, као и индустријским процесима контроле квалитета, као и на њен значај за анализу величине имунокомплекса у болестима које су њима посредоване. Поред тога, указано је на методолошка

ограничења која су до сада онемогућила да анализа величине имунокомплекса постане део рутинске дијагностичке праксе.

Теоријски део подељен је на два потпоглавља. С обзиром на то да су имуноглобулини основни градивни елемент имунокомплекса, на почетку првог потпоглавља су дати подаци о структури и функцији имуноглобулина, након чега су приказане структура и функција имунокомплекса, методе које се користе за доказивање њиховог присуства и квантификацију у телесним течностима особа оболелих од болести посредованих имунокомплексима, а затим су описане структура и патогенетски значај имунокомплекса у реуматоидном артритису (РА). У овом делу кандидаткиња је објаснила зашто су у овом раду анализирани имунокомплекси серума периферне крви, тј. циркулишући имунокомплекси (енглески: *circulating immune complexes*, CIC). Циркулишући имунокомплекси су одговарајући модел за изучавање имунокомплекса који оправдано користе и други аутори када имунокомплексе није могуће изоловати директно са места инфламације, или би њихово изоловање представљао проблем за оболелу особу. У овом делу су затим приказане методе које се најчешће примењују у научним истраживањима за анализу величине имунокомплекса: ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе, гел филтрација, микроскопија атомских сила, скенирајућа електронска микроскопија и фотон корелациона спектроскопија. Друго потпоглавље детаљно описује историјат развоја фотон корелационе спектроскопије, принципе и математичке моделе примењене у анализи резултата фотон корелационе спектроскопије, примену ове методе у фармацеутским и биотехнолошким истраживањима, као и у дијагностици. Разматрају се фактори који утичу на резултате мерења и предности фотон корелационе спектроскопије у анализи величине имунокомплекса у односу на методе које се најчешће користе у те сврхе.

У трећем поглављу докторске дисертације представљен је циљ истраживања, и описане су три главне фазе истраживања: 1) Анализа величине колоидних честица нативних имуноглобулина IgG, *in vitro* аналога имунокомплекса и *in vitro* формираних имунокомплекса, 2) Анализа величине колоидних честица у CIC здравих особа и 3) Анализа величине колоидних честица у CIC особа са РА, као модел болести посредоване имунокомплексима. У овом поглављу је шематски приказан и експериментани дизајн који је примењен да би се остварили наведени циљеви докторске дисертације.

Експериментални део подељен је на два потпоглавља. У потпоглављу Материјали дат је преглед биолошких материјала коришћених у изради докторске дисертације, као и начини прикупљања узорка и формирања група испитаника. У потпоглављу Методе описани су поступци изолације серума периферне крви, изолације IgG афинитетном хроматографијом, одређивање концентрације протеина у узорцима, доказивање чистоће изолата електрофорезом, као и детекција класа и подкласа имуноглобулина дотблот анализом. Детаљно су описани (1) поступци формирања агрегата албумина и IgG топлотом, (2) *in vitro* формирање имунокомплекса између IgG који је коришћен као антиген, и моноклонског антитела специфичног за к лаке ланце имуноглобулина човека, 3) изолација CIC из серума здравих особа и особа са РА, (4) одређивање концентрације имуноглобулина имунонефелометријском методом, (5) анализа величине честица фотон корелационом спектроскопијом, и (6) мерење зета потенцијала. Такође, описана је и анализа величине колоидних честица у узорцима нативних и агрегираних молекула албумина и IgG и циркулишућих имунокомплекса гел филтрацијом, ултрацентрифугирањем на градијенту сахарозе, скенирајућом електронском

микроскопијом (SEM) и микроскопијом атомских сила (AFM). На крају поглавља су представљени математичка обрада резултата и тестови коришћени за статистичку анализу добијених података.

Резултати и дискусија су подељени у два потпоглавља која приказују резултате добијене током истраживања у оквиру ове докторске дисертације. У првом потпоглављу приказани су резултати анализе величине и структуре *in vitro* формираних агрегата албумина и имуноглобулина, као и *in vitro* формираних имунокомплекса, с циљем испитивања могућности примене фотон корелационе спектроскопије за анализу *in vivo* формираних имунокомплекса. Анализирани су: 1) нативни и топлотом агрегиран албумин, као модел идеално глобуларног протеина, 2) нативни и топлотом агрегирани IgG молекули, који представљају *in vitro* аналоге имунокомплекса, у циљу испитивања могућности анализе IgG, али и других класа имуноглобулина чија структура одступа од идеално глобуларне, и 3) *in vitro* формиран комплекс антитела (антитело на к лаке ланце имуноглобулина) и антигена (IgG из периферне крви човека) при различитом односу антигена и антитела. Ова анализа је била важна за потврду основаности примене фотон корелационе спектроскопије за праћење промена структуре имунокомплекса формираних *in vitro*. Осим фотон корелационом спектроскопијом, величине нативних и агрегираних молекула албумина и IgG је анализирана применом ултрацентрифугирања на градијенту сахарозе, гел филтрацијом и микроскопским методама, SEM и AFM. Резултати су показали да фотон корелациона спектроскопија може прецизно детектовати промене у дистрибуцији величине честица у имунокомплексима у зависности од односа антигена и антитела. Такође, било је могуће пратити промене у величини честица након промена односа антигена и антитела, што отвара могућност за примену ове методе у анализи имунокомплекса који се природно формирају у физиолошким или патолошким условима, као и оних насталих као одговор на терапеутска антитела. Брзина извођења и прецизност дају предност ове методе у анализи величине имунокомплекса у односу на друге методе које имају одређена методолошка ограничења.

У другом потпоглављу представљени су резултати анализе величине и структуре СИС здравих особа и особа са РА. Приказани су резултати нивоа и садржаја имуноглобулина у СИС узорцима особа са РА и здравих особа као и резултати анализе величине колоидних честица СИС ове две групе испитаника, применом фотон корелационе спектроскопије у збирним и појединачним узорцима. Показана је повезаност величине колоидних честица и IgA, IgG и IgM антитела у СИС популацијама особа са РА и здравих особа. Добијени резултати су показали да је узорцима СИС и здравих особа и особа са РА на основу величине детектовано 50 типова честица. За узорке СИС особа са РА је, у односу на контролу, била карактеристична значајно већа заступљеност честица пречника 28,2, 531, 712 и 1718 nm и мања заступљеност честица пречника 78,8 nm. Промене у нивоу садржаја имуноглобулина у СИС узорцима особа са РА се нису подударале са обрасцем расподеле величина детектованих честица. Значајно повећан ниво IgA у СИС узорцима особа са РА у поређењу са контролом је повезан са 28 типова честица. Значајно повишен ниво укупних IgG у СИС узорцима особа са РА је повезан са честицама пречника 7,5, 18,2, 21,0, 24,0, 220, 396, 712, и 812 nm, а повећан ниво IgM је повезан са честицама пречника 32,7, 43,8, 220, 396, 531 и 1281 nm. Иако је повећан садржај укупног IgG детектовао код осам типова честица, повећан садржај IgG1 подкласе је детектовао на нивоу 22 типа честица, док је број типова честица које се повезују са променом садржаја других подкласа IgG био знатно мањи (један, осам и

десет типова честица за IgG2, IgG3 и IgG4), при чему ниједна честица није могла бити повезана са променом садржаја све четири подкласе IgG. Истовремено повећање нивоа укупног IgG, IgA и IgM у узорцима CIC особа са РА, у поређењу са здравим особама, показано је само у узорцима CIC који садрже честице од 220 и 396 nm.

У овом потпоглављу приказани су и резултати који су показали да замрзавање узорака CIC и њихово чување на -20 °C доводи до детектабилне промене дистрибуције величине честица у CIC. Тиме је потврђено да би за потенцијалну примену фотон корелационе спектроскопије у дијагностичке сврхе било неопходно анализирати узорак CIC непосредно након изоловања из серума пацијената.

Поглавље Резултати и дискусија се завршава упоредним приказом резултата добијених фотон корелационом спектроскопијом и других метода које се примењују за анализу величине имунокомплекса: ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе, гел филтрација и микроскопске методе (SEM и AFM). Резултати ових метода се нису могли директно упоредити, али је дискутована предност фотон корелационе спектроскопије. Наиме, фотон корелациона спектроскопија превазилази ограничења других примењених метода, због тога што не доводи до денатурације или разблаживања узорака, а брзина извођења и прецизност јој дају такође предност у анализи величине имунокомплекса у односу на друге методе које имају одређена методолошка ограничења.

У поглављу Закључак приказани су најважнији закључци изведени на основу експерименталних резултата изложених у претходним поглављима.

У делу Литература наведене су све референце цитиране у докторској дисертацији, укупно 196 референци.

У поглављу Прилози налази се 7 табела и 1 слика. У њима су приказани: 1) демографски и клинички подаци испитаника, 2) њихови индивидуални нивои CIC и нови IgA, IgG и IgM у CIC, 3) резултати мерења величине честица које улазе у састав CIC за сваког испитаника, 4) нумерички подаци за слике приказане у поглављу Резултати и дискусија, а на којима су приказани дистрибуција величине колоидних честица CIC особа са РА и здравих особа одређена фотон корелационом спектроскопијом и дистрибуција релативног садржаја IgA, IgG и IgM у CIC особа са РА и CIC здравих особа, зависно од хидродинамичког пречника честица.

### **3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ**

#### **3.1. Савременост и оригиналност**

Докторска дисертација кандидата Тамаре Н. Ђукић, магистра фармације, за предмет има савремену тему истраживања која се односи на испитивање примене фотон корелационе спектроскопије у анализи величине колоидних честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса (CIC) у дијагностичке сврхе. Фотон корелациона спектроскопија широко се примењује у истраживањима у оквиру природних, биомедицинских наука, науке о материјалима, као и индустријским процесима контроле квалитета, као индиректна метода за детекцију и праћење деградације макромолекула, њихове хомо- и хетеро- олигомеризације, полимеризације, као и за праћење формирања макромолекулских кластера у реалном времену. Постоји мали број студија чији су резултати потврдили да се применом фотон корелационе спектроскопије може детектовати присуство и анализирати величина имунокомплекса, макромолекулских агрегата формираних након везивања антигена и антитела. Стварање имунокомплекса је

саставни део имунског одговора и неопходно је за уклањање антигена 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 којом започиње елиминација антигена из организма. Међутим, од величине имунокомплекса зависи и њихов патогени потенцијал који настаје као резултат неефикасног уклањања имунокомплекса и њиховог таложења у ткивима. Реуматoidни артритис је болест која је посредована имунокомплексима и карактерише је присуство две врсте аутоантитела за које је показано да формирају имунокомплексе (реуматoidни фактори, RF и аутоантитела против цитрулинираних пептида, АСРА). Количина, састав и величина имунокомплекса у циркулацији у реуматoidном артритису одређује, између осталих фактора, тежину клиничке слике. Изучавање величине и структуре имунокомплекса није само од значаја за испитивање патогенезе и дијагностику природно насталих болести посредованих имунокомплексима, већ има велики значај за праћење ефеката (и позитивних и негативних) протеинских биотерапеутика.

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 различите микроскопске технике. Већина ових метода су релативно компликоване и захтевају доста времена (најмање два дана) за извођење. Због поменутих методолошких ограничења, оне се као веома значајне примењују у основним истраживањима структуре и функције имунокомплекса, али нису нашле своје место у рутинској дијагностици болести које су посредоване имунокомплексима. 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 (анализа једног узорка траје 20 min), не захтева посебну припрему узорка, током анализе узорак се не разблажује и не денатурише и може се користити за даље анализе.

Из свега наведеног, 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, процењена је промена величине колоидних честица СИС у болестима посредованим имунокомплексима (на моделу реуматoidног артритиса), и потврђена могућност примене ове методе за анализу величине честица у природно формираним имунокомплексима.

### 3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У докторској дисертацији Тамаре Н. Ђукић, магистра фармације и студента докторских академских студија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у

Београду, наведене су 196 библиографске јединице које су релевантне у области истраживања и указују на значај научног проблема који се испитује у овој докторској дисертацији. У оквиру литературних навода налазе се, углавном, референце новијег датума. Такође, може се уочити и присуство референци старијег датума у којима се налазе основе поставке из теорије на којима се заснива метода фотон корелационе спектроскопије и анализе СИС. Сходно овоме, може се извести закључак да су истраживања која су приказана у наведеним референцама била од користи приликом постављања методологије експерименталног рада, анализе и дискусије добијених резултата.

### 3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Резултати који су приказани у оквиру ове докторске дисертације су добијени одговарајућим експериментима, применом савремених препаративних и аналитичких инструменталних метода, према оригиналним или модификованим процедурама из литературе. Серуми периферне крви испитаника контролне и експерименталне групе добијени су у складу са Етичким кодексом Светског медицинског удружења (Декларација Хелсинки) и одобрени од стране одговарајућих Етичких комитета, након писмених информисаних пристанака испитаника. Молекули IgG изоловани су афинитетном хроматографијом, док је идентификација и анализа степена пречишћености IgG молекула проверена дисконтинуираном електрофорезом на гелу од полиакриламида са додатком натријум-додецил-сулфата. Изоловани IgG (из збирних узорака серума здравих људи) и албумин (комерцијални препарат) агрегирани су топлотом, а ефикасност денатурације и агрегације је процењена на основу мерења апсорбанције на 280 nm и 350 nm. *In vitro* имунокомплекси су формиран у реакцији афинитетно изолованог IgG и моноклонског антитела миша специфичног за к лаке ланце имуноглобулина човека. СИС из серума здравих особа и особа са РА изловани су преципитацијом полиетилен гликолом, док је ниво имунокомплекса одређен мерењем апсорбанције на 350 nm. Концентрација протеина у свим узорцима је одређена комерцијалним тестом бицинхонинске киселине. Дотблот анализа је коришћена за детекцију присуства класа имуноглобулина (IgG, IgA, и IgM) и подкласа IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) у препаратима IgG афинитетном хроматографијом, као и за семиквантитативно одређивање садржаја укупног IgG, IgA и IgM и подкласа IgG у свим узорцима СИС. Одређивање концентрације имуноглобулина у узорцима афинитетно изолованих IgG рађено је имунонефелометријском методом. Величина колоидних честица и зета потенцијал у свим узорцима анализирани су фотон корелационом спектроскопијом. Такође, величина колоидних честица анализирана је и гел филтрацијом, ултрацентрифугирањем на градијенту сахарозе, као и микроскопским методама (SEM и AFM). Максимуми расподеле величина честица добијених фотон корелационом спектроскопијом детектовани су помоћу *Excel* програмског пакета и *R* програмског језика. Израчунавање дескриптивне статистике извршено је за сваки анализирани параметар посебно, коришћењем софтвера SPSS v.25.

### 3.4. Применљивост остварених резултата

Резултати приказани у оквиру ове докторске дисертације показују да је мерењем величине колоидних честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса здравих особа и особа са реуматоидним артритисом фотон корелационом спектроскопијом било могуће формирати референтни систем дистрибуције величине честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса здравих особа и особа са реуматоидним артритисом. Такође, показују да фотон корелациона спектроскопија превазилази ограничења других метода у анализи величине честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса, пре свега дуго време извођења анализе, денатурацију и разблаживање узорка.

За поуздану примену у клиничкој дијагностици потребно је спровести студије већег обима како би се, уз примену машинског учења, направио поуздан модел који дефинише величине честица карактеристичне за одређене болести. Ови подаци би се затим могли користити за дијагнозу, праћење прогресије болести и тестирање ефикасности различитих терапијских протокола, укључујући класичне лекове и биотерапеутике.

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

У свом досадашњем истраживачком раду кандидат Тамара Н. Ђукић, магистар фармације, показала је стручност и самосталност у претраживању и коришћењу научне литературе, планирању и реализацији експеримената кроз модификацију примењених процедура и метода, обради и анализи добијених података, дискусији резултата и припреми публикација. Комисија је на основу досадашњег залагања и постигнутих резултата, као и на основу поднете докторске дисертације, утврдила да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

## **4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС**

### 4.1. Приказ остварених научних доприноса

Научни доприноси резултата истраживања остварених у оквиру ове докторске дисертације се огледају у следећем:

- Развијена је фотон корелациона спектроскопија као метода за детектовање промене величине колоидних честица у агрегираним IgG у односу на нативне IgG.
- Развијена је фотон корелациона спектроскопија као метода за праћење динамичке промене величине колоидних честица у *in vitro* формираним имунокомплексима које настају као последица промене односа антигена и антитела.
- Показано је да се циркулишући имунокомплекси здравих особа и особа са реуматоидним артритисом могу изоловати преципитацијом поли(етилен гликолом).
- Дефинисан је референтни систем дистрибуције величине честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса здравих особа и особа са реуматоидним артритисом.

➤ Показана је повезаност између нивоа имуноглобулина и величина колоидних честица у циркулишућим имунокомплексима.

➤ Утврђена је предност фотон корелационе спектроскопије у односу на друге методе које се користе за одређивање величина честица које улазе у стастав циркулишућих имунокомплекса.

#### 4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Резултати проистекли из ове докторске дисертације показали су да је применом фотон корелационе спектроскопије могуће проценити величину колоидних честица у имунокомплексима формираним у физиолошким и патолошким стањима људи (на моделу болести реуматоидног артритиса).

Поредећи дистрибуцију величине честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса особа са реуматоидним артритисом са дистрибуцијом величине честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса здравих особа, дефинисале су се величине честица које се накупљају у циркулишућим имунокомплексима особа са реуматоидним артритисом. Показана је повезаност између величина тих честица и концентрације одређених класа имуноглобулина (IgG, IgA и IgM), као главних молекулских конституената циркулишућих имунокомплекса. Ова корелација је од значаја за испитивање патогенезе и дијагностику реуматоидног артритиса, али и других болести посредованих имунокомплексима.

У овој докторској дисертацији анализиран је одговарајући број узорака (30 узорака циркулишућих имунокомплекса здравих особа и 30 узорака циркулишућих особа са реуматоидним артритисом) за остваривање задатих циљева. Међутим, у наставку рада на овом проблему потребно је спровести студије већег обима како би се, уз примену машинског учења, направио поуздан модел који дефинише величине честица карактеристичне за болести у чију патогенезу су укључени имунокомплекси. Ови подаци би се затим могли користити за дијагнозу, праћење прогресије болести и тестирање ефикасности различитих терапијских протокола, укључујући класичне лекове и биотерапеутике.

#### 4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Тамара Н. Ђукић, магистар фармације и студент докторских академских студија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду резултате свог истраживања током израде ове дисертације потврдила је објављивањем радова у часописима међународног значаја, као и саопштавањем радова на међународним и домаћим скуповима. Резултате свог досадашњег научноистраживачког рада које је приказала у својој докторској дисертацији објавила је у укупно 7 публикација, од тога два (2) рада у часописима међународног значаја од којих је један (1) рад публикован у врхунском међународном часопису (M21), један рад у истакнутом међународном часопису (M22), три (3) саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34), као и два (2) саопштења на скупу националног значаја штампана у изводу (M64).

Списак научних радова категорија M20 који су произашли као резултат рада кандидата на докторској дисертацији:

Радови у врхунским међународним часописима (M21):

1. **Djukić T**, Drvenica I, Kovačić M, Milanović S, Majerič D, Šefik-Bukilica M, Miletić M, Bugarski B, Ilić V. Exploring the Link between Hydrodynamic Size and Immunoglobulins of Circulating Immune Complexes in Rheumatoid Arthritis Patients. International Journal of Molecular Sciences. 2024, 25(6), 3138. IF(2023)=4,9, ISSN: 1422-0067, <https://doi.org/10.3390/ijms25063138>.

Радови у истакнутим међународним часописима (M22):

1. **Djukić T**, Drvenica I, Kovačić M, Minić R, Vučetić D, Majerič D, Šefik-Bukilica M, Savić O, Bugarski B, Ilić V. Dynamic Light Scattering Analysis of Immune Complexes in Sera of Rheumatoid Arthritis Patients. Analytical Biochemistry 2023, 674, 115194. IF(2022)=2,9, ISSN 0003-2697, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115194>.

## 5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу података и резултата који су претходно представљени, Комисија закључује да докторска дисертација кандидата Тамаре Н. Ђукић представља значајан допринос у научној области којој припада, што је и потврђено објављивањем радова у реномираним научним часописима међународног значаја. Предмет и циљеви који су постављени су јасно наведени и у потпуности остварени. Комисија је мишљења да ова докторска дисертација испуњава све захтеване критеријуме као и да је кандидат током израде докторске дисертације показао самосталност, креативност и одговорност у свим њеним фазама израде.

Имајући у виду обим, сложеност и научни допринос постигнутих резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и да га заједно са поднетом докторском дисертацијом кандидаткиње Тамаре Н. Ђукић под насловом: „Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе “ изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду, као и да након завршетка процедуре позове кандидата на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 10. октобра 2024. године

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

---

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

---

др Соња Јаковетић Танасковић, доцент  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

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

---

др Маријана Ковачић, научни сарадник  
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања,  
Институт од националног значаја за Републику Србију