

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 11.05.2017. godine, izabrani smo za članove Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Jasne Nikolić, master biohemičara, istraživača saradnika na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod naslovom:

“Unapređenje dijagnostičkih reagenasa za alergiju na bananu”.

Na osnovu pregleda disertacije, Nastavno-naučnom veću podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Jasne Nikolić napisana je na 115 strana i sastoji se iz sledećih delova: **Uvod** (1 strana), **Opšti deo** (41 strana), **Cilj** (1 strana), **Naši radovi** (27 strana), **Diskusija** (2 strane), **Zaključak** (1 strana), **Eksperimentalni deo** (29 strana) i **Literatura** (13 strana sa 214 literaturnih navoda). Pored navedenog, rad sadrži i Izvod na srpskom i engleskom jeziku, zahvalnicu, spisak skraćenica, sadržaj, prilog sa etičkim dozvolama i publikacijama koje čine deo teze, i biografiju doktoranda. U radu se nalazi ukupno 15 tabela i 33 slike.

U **Uvodu** je opisana molekulska osnova razvoja alergije na hranu i važnost blagovremenog i pouzdanog dijagnostifikovanja alergije. Predstavljen je problem dijagnostifikovanja alergije na bananu i ukazano je na značaj unapređenja dijagnostike na ovo voće koje se konzumira širom sveta, i koje je često zastupljeno u ishrani dece i odojčadi.

U odeljku **Cilj** je naveden predmet istraživanja ove teze koji podrazumeva detekciju, izolovanje i karakterizaciju novih alergena, kao i unapređenje protokola za dobijanje alergena banane koji su već prethodno registrovani i okarakterisani kao dominantni u tkivu banane.

Opšti deo opisuje razvoj, učestalost i prateće kliničke manifestacije alergijskih oboljenja, pre svega

alergije na hranu. Naveden je istorijat razvoja alergija, otkriće IgE antitela, i objašnjeni su patološki mehanizmi koji dovode do razvoja ovog hroničnog oboljenja. Posebna pažnja je posvećena alergijskim reakcijama na proteine hrane. Detaljno su izložena dosadašnja saznanja vezana za alergiju na bananu kao i problemi koji su zabeleženi u kliničkoj dijagnostici.

Naši radovi su opisani u okviru 11 celina i sadrže 3 tabele i 19 slika. U cilju definisanja panela klinički značajnih alergena banane, u okviru ovog istraživanja uključena je grupa selektovanih pacijenata sa kliničkom istorijom alergije na bananu. Serumi alergičnih pacijenata su korišćeni za detekciju i procenu dijagnostičkog potencijala pojedinačnih alergena. Tehnika 2D imunoblota je korišćena za karakterizaciju IgE reaktivnih komponenti ekstrakta banane. Identifikacija prečišćenih proteina je takođe utvrđena tehnikama Edmanove degradacije i masene spektrometrije (eng. *mass fingerprint*). Kombinovanjem tehnika visokorezolutivne 2D-PAGE sa masenom spektrometrijom, određena je aminokiselinska sekvenca važnih alergena banane. Optimizovani su postupci za izolovanje i prečišćavanje alergena banane standardnim biohemijskim tehnikama, dok je za detekciju novih alergena korišćena metoda dubinske (eng. *in depth*) proteomike uz upotrebu biblioteka kombinatornih peptidnih liganada (end. *CPLL*).

Dobijeni rezultati su komentarisani i upoređeni sa literaturnim podacima u okviru **Diskusije**, a zatim sumirani u **Zaključku**.

U **Eksperimentalnom delu** su detaljno opisane metode koje su korišćene u radu. Navedena je čistoća i poreklo hemikalija koje su korišćene u radu, kao i osnovne karakteristike korišćene opreme.

Literatura sadrži 214 literaturnih navoda, označenih brojevima u skladu sa redosledom pojavljivanja u tekstu.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ovog istraživanja imaju za cilj da se unaprede dijagnostički reagensi bazirani na pojedinačnim komponentama za detekciju alergijske reakcije na bananu. S obzirom na to da banana sadrži komponente koje ometaju ekstrakciju proteina a koje su prisutne i u drugom voću, metodologija pripreme proteinskog ekstrakta koja je optimizovana u okviru ove teze bi se verovatno mogla primeniti u pripremi proteinskih ekstrakata za detekciju IgE reaktivnih komponenti i iz drugog voća. U ovom radu je pokazano da komercijalno dostupni reagensi za alergiju na bananu

moгу dati lažno negativne rezultate u dijagnostici čak i kod pacijenata kod kojih je došlo do anafilaksije nakon konzumiranja banane. Unapređenje dijagnostike u smislu pouzdanosti i osetljivosti alergije na bananu je postignuto korišćenjem panela prečišćenih alergena banane.

U cilju unapređenja dijagnostičkih reagenasa za alergiju na bananu, najpre su simultano izolovana tri dominantna alergena iz banane. Razvijen je jednostavan metoda za dobijanje prečišćenih alergena Mus a 2, Mus a 4 i Mus a 5. Njihova upotreba, kao i prednost u odnosu na komercijalne reagense je pokazana kod pacijenata alergičnih na bananu.

Korišćenjem biblioteka kombinatorijalnih peptidnih liganada uravnotežena je količina pojedinačnih proteina prisutih u ekstraktu banane koji je zatim analiziran u 2D-PAGE. Zatim u 2D imunoblotu uz korišćenje seruma osoba alergičnih na bananu detektovani su alergeni iz banane. Identitet IgE reaktivnih proteina u 2D imunoblotu je potvrđen tehnikama masene spektrometrije. Katalaza iz banane je identifikovana kao IgE reaktivan protein i zatim proizvedena u enzimski aktivnom obliku, tehnikom rekombinantne DNK tehnologije, i imunohemijskim metodama okarakterisana je kao novi alergen.

Na ovakav način je pripremljen panel od četiri prečišćena alergena banane u dovoljnoj količini i zadovoljavajuće čistoće, u cilju primene u dijagnostici alergije na bananu koja je zasnovana na razdvojenim komponentama.

Karakterizacija prečišćenih alergena je urađena biohemijskim (1D- i 2D-PAGE, masena spektrometrija) i imunohemijskim metodama (1D i 2D imunoblot). Pripremljeni reagensi su pokazali veću osetljivost u detekciji IgE antitela u odnosu na alergenske ekstrakte koji se rutinski koriste u kliničkoj dijagnostici. Rezultati dijagnostike sa pripremljenim reagensima su u korelaciji sa medicinskom istorijom pacijenata koji su bili uključeni u istraživanje.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Literaturni navodi ukazuju na to da je učestalost pojave alergija na hranu u stalnom porastu i predstavlja ozbiljan zdravstveni problem u svetu. Osim uobičajnih alergija na hranu kao što su alergije na jaja, morske plodove, ribu, koštuničave plodove i mleko, u svetu su sve učestalije alergije na voće, naročito na bananu, kivi, breskvu i jabuku.

Reagensi bazirani na alergenskim ekstraktima koji se koriste u kliničkoj praksi često daju lažno

negativnu sliku o postojanju alergijske reakcije na voće, i za sada postoji ograničen panel komercijalno dostupnih prečišćenih alergena za dijagnostiku (*component resolved*) uglavnom inhalatornih alergena. Ovaj problem je opisan kako u literaturi, tako i u ovom radu gde je ukazano na to da komercijalno dostupni reagensi nisu detektovali alergiju kod pacijenta koji je imao anafilaksiju nakon konzumiranja banane. Takođe je poznato da ekstrakti hrane biljnog porekla koji se koriste u dijagnostičke svrhe predstavljaju mešavine alergena i nealergenih komponenti. Problemi u standardizaciji ekstrakata alergena iz biljne hrane, uključujući i bananu, predstavljaju varijacije u nivoima ekspresije proteina tokom zrenja i skladištenja u različitim uslovima, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Iz tog razloga je novi koncept u molekularnoj alergologiji zamena alergenskog ekstrakata panelom IgE reaktivnih molekula iz određenog alergenskog izvora (*component-resolved diagnosis*, CDR), što se smatra obećavajućom strategijom za unapređenje dijagnostike alergije na hranu. U ovom radu je opisana priprema upravo takvog panela alergena, uz eksperimentalnu potvrdu o njihovoj IgE reaktivnosti. Takođe je iskorišćen metod za prevazilaženje razlika u zastupljenosti pojedinačnih proteina sadržanih u ekstraktu, uz pomoć biblioteka kombinatornih peptidnih liganada. Upotreba biblioteka kombinatornih peptidnih liganada u proteomici je opisana u literaturi, ali nema podataka da je ranije korišćena za detekciju IgE reaktivnih proteina iz banane.

Molekulska osnova alergije na bananu je do sada dovedena u vezu sa šest alergena registrovanih kod Međunarodnog Udruženja Imunoloških Društava Svetske Zdravstvene Organizacije (IUIS/WHO) i ti podaci se nalaze u bazama podataka dostupnim na internetu. Ranija istraživanja su pokazala da se do sada registrovani alergeni iz banane (Mus a 2, Mus a 4, Mus a 5) u proteinskom ekstraktu nalaze kao najzastupljeniji, pa ih je zbog dostupnosti bilo jednostavno izolovati i ispitati. U ovom radu je razvijen protokol simultanog izolovanja glavnih alergena banane koji su se već nalazili u okviru IUIS liste alergena, dok su u dosadašnjim literaturnim podacima opisani komplikovaniji pojedinačni protokoli za njihovo prečišćavanje.

Pored do sada registrovanih alergena koji se nalaze u okviru zvanične liste [www-allergen.org](http://www.allergen.org), u literaturi je opisano kao i u ovom radu, da ovaj alergeni izvor sadrži dodatne IgE reaktivne proteine koje je potrebno izolovati, okarakterisati i odrediti njihov klinički značaj. U okviru ove disertacije je među detektovanim IgE reaktivnim proteinima iz banane prepoznata katalaza, koja prema literaturnim podacima do sada nije poznata i registrovana kao alergen iz banane.

D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

Radovi objavljeni u vodećim časopisima međunarodnog značaja (M21):

- Jappe U., Nikolic J., Opitz A., Homann A., Zabel P., Gavrovic-Jankulovic M. Apparent IgE negative anaphylactic reaction to banana combined with kiwi allergy – complementary diagnostic value of purified single banana allergens. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology J Eur Acad Dermatol Venereol. (2016) 30:1220-2 DOI:10.1111/jdv.13146
- Nikolic J., Mrkic I., Grozdanovic M., Popovic M., Petersen A., Jappe U., Gavrovic-Jankulovic M. Protocol for simultaneous isolation of three important banana allergens. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. (2014) 962:30-6

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M23):

- Klein H., Nikolic J., Gavrovic-Jankulovic M., Jappe U. Anaphylactic reaction to banana:genuine class I food allergy–pollen-food or latex-fruit syndrome? Allergologie (2013) 36 :384-391

Radovi na recenziji

- Nikolic J., Nestic A., Kull S., Schocker F., Jappe U., Gavrovic-Jankulovic M. Employment of combinatorial peptide ligand libraries for the identification of catalase as novel allergen from banana fruit.

Poglavlja u knjigama

- Nikolic J., Popovic, M., Gavrovic-Jankulovic, M. Bananas: Cultivation, Consumption and Crop Diseases (2016) Banana as a Food Allergen Source, Nova Science publishing, Chapter 5 pp. 107-126, ISBN 978-1-63485-429-0

Saopštenja sa skupova međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34):

- Nikolic J., Grozdanovic, M., Petersen, A., Gavrovic-Jankulovic, M. Optimization of Mus a 2 allergen purification from banana fruit. Belgrade International Food Conference, Belgrade, 2012. Book of abstracts, pp. 91

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64):

- Nikolic J., Kull S., Schocker F., Jappe U., Gavrovic-Jankulovic M. Development of high resolution 2D map of *Musa acuminata* proteins using combinatorial peptide ligand libraries for the detection of novel allergens. Fifth Conference of Serbian Biochemical Society, Belgrade, 2015. Book of abstracts, pp. 117-119
- Nikolic J., Grozdanovic M., Gavrovic Jankulovic M. Optimization of Mus a 2, Mus a 4 and Mus a 5 allergens purification from banana fruit. Prva konferencija Kluba mladih hemičara, Belgrade, 2012. Book of Abstracts
- Nikolic J., Grozdanovic M., Gavrovic-Jankulovic M. Optimization of purification of beta-1,3-glucanase and thaumatin-like protein from banana fruit. L Jubilarno Savetovanje Srpskog hemijskog društva. Belgrade, 2012., Book of Abstracts, pp. 34.

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)

Komisija je pregledala doktorsku disertaciju kandidata Jasne Nikolić pod naslovom “**Unapređenje dijagnostičkih regenasa za alergiju na bananu**” i zaključila da je disertacija rezultat samostalnog rada kandidata, kao i da dobijeni rezultati predstavljaju originalan doprinos naučnoj oblasti molekulske alergologiju i proteinske biohemije. U ovoj disertaciji je predstavljen panel od četiri IgE reaktiva proteina banane koji omogućavaju precizniju kliničku dijagnostiku alergije na bananu, kao i metode za njihovo dobijanje.

Izloženi rezultati su objavljeni u dva naučna rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21), u jednom naučnom radu međunarodnog značaja (kategorije M23), prikazani na jednom naučnom skupu internacionalnog značaja (kategorije M34) i tri naučna skupa nacionalnog

značaja (kategorije M64), dok se jedan naučni rad nalazi na recenziji.

Na osnovu svega navedenog Komisija predlaže Naučno nastavnom veću Hemijskog fakulteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju master biohemičara Jasne Nikolić i odobri njenu javnu odbranu.

Beograd, 10.09.2017. godine

Članovi komisije:

1. dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (mentor),

2. dr Tanja Ćirković Veličković, redovni profesor Hemijskog fakulteta u Beogradu,

3. dr Zoran Vujčić, redovni profesor Hemijskog fakulteta u Beogradu,

4. dr Lidija Burazer, viši naučni saradnik Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak"
