

**НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду одржаној 09.06.2016. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед и оцену докторске дисертације Иване Д. Лукић пријављене под насловом:

„Терапеутски потенцијал анти-тетанус токсид моноклонских антитела: примена заснована на везивним карактеристикама“

Комисија у истом саставу је прегледала докторску дисертацију и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Иване Д. Лукић под наведеним насловом написана је на укупно 104 стране А4 формата (проред 1,5) и садржи 32 слике и 10 табела. Пагинирани текст докторске дисертације чине следећа поглавља: Увод (3 стране), Општи део (15 страна), Циљеви истраживања (2 стране), Наши радови (40 страна), Експериментални део (23 стране), Закључци (3 стране), Литература (12 страна) и Прилози (6 страна). Дисертација садржи и уобичајене уводне (непагиниране) стране са неопходним информацијама о докторској дисертацији: сажетак са кључним речима и подацима о научној области на српском (3 стране) и енглеском језику (3 стране), листу скраћеница (2 стране) и садржај (3 стране). Поред наведеног, на крају докторске дисертације налазе се биографију аутора (1 страна), публиковани радови из докторске дисертације и обавезне изјаве (Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу).

У поглављу **Увод** је укратко представљена област истраживања са освртом на актуелност проблематике и потенцијални значај планираних истраживања. Образложена је потреба за развојем препарата на бази моноклонских антитела (МАт) за третман тетануса и наведени аспекти које је потребно разматрати. Поред тога, указано је и на оправданост разматрања доприноса тетанус токсид (ТТд) / тетанус токсин (ТТ) – специфичних антитела у контексту хетерологе имуности.

У поглављу **Општи део** наведени су подаци о учесталости тетануса и дат је преглед литературе која се односи на:

а) структуру ТТ-а и механизам који је у основи његовог токсичног ефекта, са посебним освртом на конкретану улогу специфичних домена ТТ-а

б) актуелне приступе у третману (превенција и терапија) тетануса и могућност њиховог даљег усавршавања, са освртом на начин спровођења и значај систематске имунизације ТТд-ом, улогу специфичних антитела у спречавању интоксикације ТТ-ом, проблеме повезане са употребом ТТ-специфичних препарата на бази поликлонских антитела или њихових фрагмената и резултате који указују на потребу и оправданост разматрања примене МАт у третману тетануса

в) допринос имунизације ТТд-ом отпорности ка хетерологим инфекцијама, са посебним освртом на податке који указују да би ТТд-ом-покренут имунски одговор могао доприносити отпорности ка окуларним хламидијалним инфекцијама.

У поглављу **Циљеви истраживања** је наведено да је главни циљ докторске дисертације утврђивање у којој мери везивне карактеристике ТТд / ТТ-специфичних антитела одређују њихову способност да спрече интоксикацију ТТ-ом и / или да допринесу отпорности ка хетерологим инфекцијама. Поред тога, укратко је описано како је предвиђено да се наведени циљ оствари.

У поглављу **Наши радови** приказани су и дискутовани добијени резултати. Резултати су представљени у виду 7 табела и 19 слика. Експериментални рад је реализован кроз три фазе у оквиру којих је изведен низ *in vitro* и *in vivo* истраживања у где је коришћен панел од осам ТТд / ТТ – специфичних МАт, урађене биоинформатичке анализе и статистичка обрада резултата. У складу са тим, поглавље се састоји из три дела у којима су приказани добијени резултати. У првом делу су представљени резултати на основу којих су дефинисане кључне везивне карактеристике анти-ТТд / ТТ МАт која могу да *in vivo* обезбеде заштиту од интоксикације ТТ-ом. У другом делу су приказана испитивања узajамног утицаја анти-ТТд / ТТ МАт при истовременом везивању за ТТ и његовог значаја у побољшању заштитног потенцијала ТТ-специфичних биклоналних еквимоларних препарата на бази МАт. Трећи део садржи приказ резултата који се односе на улогу хетерологе имуности посредоване ТТд / ТТ-специфичним антителима у отпорности ка окуларним хламидијалним инфекцијама.

Поглавље **Експериментални део** садржи информације о хемикалијама, ћелијским културама и експерименталним животињама које су коришћене током израде ове докторске дисертације. Детаљно су описани примењивани експериментални протоколи (поступци хроматографског пречишћавања МАт и ТТ / ТТд, рад са ћелијским културама и *in vivo* третмани) и аналитичке методе (тестирања на принципу ELISA-е, електрофорезе, *Western blot*, имуноцитохемијске анализе, спектрофотометријске методе). Такође, наведени су подаци о примењеним биоинформатичким приступима и методама коришћеним за статистичку обраду резултата.

У поглављу **Закључци** су сумирани добијени резултати. Кандидаткиња је, по фазама експерименталног рада, извела опште закључке и навела закључке донете на основу резултата појединачних анализа који представљају основ за претходно споменуте опште закључке.

Поглавље **Литература** чини списак 154 библиографске јединице из области истраживања докторске дисертације. Литературни извори су адекватно цитирани у тексту дисертације.

У поглављу **Прилози** су представљени подаци који се односе на пречишћавање МАт и тетанусних антигена (ТТ и ТТд) који су коришћени у раду.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У оквиру докторске тезе Иване Д. Лукић показано је да је афинитет ка ТТ-у први критеријум за селекцију заштитних ТТд / ТТ-специфичних антитела, а потом способност да инхибирају успостављање ТТ- G_{D1b} интеракције. Добијени резултати су указали да антитело које може *in vivo* да обезбеди заштиту од ТТ интоксикације треба да везује ТТ са афинитетом $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ и то тако да превенира успостављање ТТ-G_{D1b} интеракције. Такође, показано је да у случају анти-ТТд / ТТ антитела чија је афинитета према ТТ-у $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, *in vivo* заштитни потенцијал директно корелира са способношћу инхибирања ТТ- G_{D1b} интеракције, а не самим афинитетом. До ових закључака се дошло корелационом анализом *in vitro* добијених података који се односе на афинитет селектованих МАт за ТТ, брзину формирања ТТ-МАт комплекса, способност везивања МАт за ТТ-G_{D1b} комплекс и капацитет МАт да инхибирају ТТ-G_{D1b} интеракцију, са подацима који се односе на *in vivo* заштитни потенцијал селектованих ТТд / ТТ-специфичних МАт. Ови резултати су публиковани у истакнутом међународном часопису (M22) *Toxicon*.

Испитивања могућности добијања ефикаснијих ТТ-препарата су показала да се комбиновањем два ТТ-специфична МАт може добити препарат чији је *in vivo* заштитни потенцијал бољи у односу на његове конституенте. Предуслов је да МАт која се комбинују могу истовремено да интерагују са ТТ-ом и да при симултаном везивању испољавају позитиван кооперативни ефекат. Бољи заштитни потенцијала препарата који садрже два анти-ТТд / ТТ МАт у истим количинама (БЕП) је био последица промене карактеристика везивања БЕП за ТТ у односу на одговарајућа појединачна МАт у смислу ефикасније инхибиције успостављања ТТ-G_{D1b} интеракције и повећања просечног афинитета према ТТ-у. У оквиру ових истраживања је показано и да ТТ-специфична МАт која сама не могу да обезбеде потпуну заштиту од ТТ-интоксикације, могу да буду значајан конституент ТТ-специфичних БЕП у случајевима када испољавају позитиван ефекте на везивање другог МАт. Ови резултати су публиковани у врхунском међународном часопису (M21) *Vaccine*.

У оквиру истраживања фокусираних на хетерологу имуност посредовану ТТд / ТТ-специфичним антителима показано је да анти-ТТд / ТТ антитела могу унакрсно реаговати са хламидијалним протеинима. Биоинформатичким приступом је показано да на нивоу примарне структуре (пептидних секвенци) постоји сличност између ТТ и одређених површинских хламидијалних протеина (МОМР и PmpC). Такође, показано је да анти-ТТд /

ТТ МАт могу интераговати и са хламидијалним антигенима адсорбованим на пластици или у раствору. Дозно-зависно смањење броја хламидијом инфицираних хуманих коњунктивалних епителних ћелија (*in vitro* модел хламидијалне инфекције) и ублажавање клиничке слике окуларне хламидијалне инфекције (модел инклузионог коњунктивитиса заморчета) у присуству анти-ТТд / ТТ МАт, су указали да успостављање интеракција ТТд / ТТ – специфичних антитела са хламидијалним антигенима има и функционални значај.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Литературно доступни подаци указују да се већ дуже време разматра могућност примене МАт у третману тетануса. Резултати добијени током израде докторске тезе Иване Д. Лукић су у складу са резултатима истраживања која су показала да је за превенцију интоксикације ТТ-ом кључно спречавање иницијалног контакта ТТ-а са неуронима где важну улогу има везивање ТТ-а за мембранске ганглиозиде (*J Biol Chem* 2009; 284: 26569). Поред тога, добијени резултати су у сагласности и са подацима који показују да спречавање ТТ-ганглиозид интеракције не подразумева нужно маскирање ганглиозид-везујућег места ТТ-а МАт-ом него, услед флексибилности ТТ молекула, може бити и последица конформационих промена индукованих интеракцијом МАт са ТТ-ом (*Infect Immun* 1984; 45: 604, *Mol Immunol* 2010; 47: 1931). Кроз истраживања приказана у докторској дисертацији дефинисане су карактеристике ТТд / ТТ-специфичних антитела које могу бити одређене *in vitro*, а на основу којих се може предвидети заштитни потенцијал анти-ТТд / ТТ антитела. Закључак да је заштитни потенцијал ТТд / ТТ-специфичних антитела одређене њиховим афинитетом ка ТТ-у и способношћу да превенирају ТТ-ганглиозид интеракцију је у складу са налазима који се односе на карактеристике антитела која могу да обезбеде заштиту против ботулиnum токсина (*Mov Disord* 2004; 19: S101), токсина који је по структури и механизму дејства врло сличан ТТ-у. Дефинисањем кључних карактеристика заштитних ТТд / ТТ-специфичних антитела створени су предуслови за ефикаснију селекцију МАт која би се могла користити за третман тетануса што, између осталог, подразумева и смањење потребе за *in vivo* тестирања на животињама.

Примена МАт у третману различитих патолошких стања, у односу на одговарајуће специфичне поликлонске серуме, има предности које се првенствено огледају у могућности ефикасније производње потребне количине препарата конзистентних карактеристика и смањењу евентуалних нежељених ефеката услед могућности прецизније карактеризације и контроле квалитета. Међутим, дефинисана специфичност МАт може представљати и слабост препарата базираних на само једном МАт јер их, у случају различитих структурних промена / варијација циљног антигена, може учинити мање ефикасним. Поред тога, препарати на бази једног МАт имају мањи опсонизациони капацитет у односу на поликлонске препарате и стога мање ефикасно могу покретати ефекторске механизме за уклањање циљног антигена. Покушаји да се ови недостатци превазиђу, а при томе сачувају предности, подразумевају формулисање препарата који садрже више МАт (*Trends Biotechnol* 2007; 25: 390). У литератури постоје подаци који иду у прилог претпоставци да би и у третману тетануса олигоклонски препарати могли бити ефикаснији од појединачних

МАт. Студије које су до сада рађене обухватале су или *in vivo* истраживања у којима је показана супериорност одређених олигоклонских формулација али без *in vitro* анализа њихових везивних карактеристика (*Infect Immun* 1984; 45: 604, *J Immunol* 1993; 151: 466, *Human Vaccines Immunother* 2014; 10: 344), или *in vitro* одређивања карактеристика везивања која су била основ за претпоставку да би заштитни потенцијал могао бити бољи али без јасне потврде *in vivo* (*Mol Immunol* 2010; 47: 1931). У оквиру ове тезе је показано да промене карактеристика везивања МАт (првенствено пораст афинитета и способности превенције ТТ- G_{D1b} интеракције) услед позитивног кооперативног ефекта при симултаном везивању за ТТ позитивно корелирају са порастом *in vivo* заштитног потенцијала биклоналних еквимоларних препарата у односу на конституенте.

Литературно доступни подаци указују да би ТТд / ТТ-специфична МАт, главни носиоци имуности против тетануса, могли доприносити и отпорности на хетерологе инфективне агенсе. Претпоставка да би ТТд / ТТ-специфична антитета могла допринети отпорности ка хламидијалним инфекцијама базирана је на сазнањима о улози антитета у отпорности ка хламидијалним инфекцијама (*Eye* 1991; 5: 299, *Infect Immun* 1993; 39: 463), чињеници да је у различитим старосним популацијама имунизованим поливалентним вакцинама које садрже ТТд измерен значајно виши ниво антитета специфичних за хламидијалне антигене у односу на неимунизоване јединке (*J Infect Dis Immun.* 2010; 2: 1-14, *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 586), као и на временском поклапању спровођења масовне имунизације против тетанус са падом учесталости окуларних хламидијалних инфекција. У овој докторској дисертацији је показано да ТТд / ТТ – специфична антитета могу да унакрсно интерагују са хламидијалним антигенима и да успостављање те интеракције има функционални значај у смислу смањења интензитета окуларне хламидијалне инфекције.

Г. Објављени или саопштени радови који чине део докторске дисертације

Радови публиковани у међународним часописима (M20)

1. **Lukić I**, Filipovic A, Inic-Kanada A, Marinkovic E, Miljkovic R, **Stojanovic M**. Cooperative binding of anti-tetanus toxin monoclonal antibodies: implications for designing an efficient bivalent preparation to prevent tetanus toxin intoxication. *Vaccine* 2018; 36(26): 3764-3771

Категорија M21: 2015 – *Medicina, istraživanje i eksperimenti* 36/124, ИФ 3,413

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X18306789>

2. **Lukić I**, Marinković E, Filipović A, Krnjaja O, Kosanović D, Inić-Kanada A, **Stojanović M**. Key protection factors against tetanus: Anti-tetanus toxin antibody affinity and its ability to prevent tetanus toxin - ganglioside interaction. *Toxicon* 2015; 103: 135-144

Категорија M22: 2013 – *toksikologija* 35/87, ИФ 2,581

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115001725?via%3Dihub>

Саопштења на међународним скуповима (M34)

1. Inic-Kanada A, **Lukic I**, Stojanovic M, Stein E, Marinkovic E, Filipovic A, Djokic R, Kosanovic D, Schuerer N, Ghasemian E, Barisani-Asenbauer T. Anti-tetanus antibodies confer modest heterologous protection against ocular chlamydial infection. *ÖGAI 2017 – Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology*, Већ, Austrija, 23-25. новембар 2017. године, Book of abstracts p43 (P06)
2. Inic-Kanada A, **Lukic I**, Stojanovic M, Stein E, Marinkovic E, Filipovic A, Djokic R, Kosanovic D, Schuerer N, Ghasemian E, Barisani-Asenbauer T. Tetanus vaccination related to the decline of trachoma in the Western World? Anti-tetanus antibodies confer partial protection against ocular chlamydial infection. *ARVO 2017 Annual Meeting, Baltimor, SAD*, 7-11. мај 2017. године, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58: 5777
3. Filipović A, **Lukić I**, Marinković E, Krnjaja O, Kosanović D, Inić-Kanada A, Stojanović M. The protective potential of individual anti-tetanus monoclonal antibodies is improved if used in combination with another MAb able to bind tetanus toxin simultaneously. *3rd Belgrade EFIS Symposium on Immunoregulation, Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging*, Aranđelovac, Србија, 24-27. мај 2015. године, Book of abstracts p 42

Саопштења на скуповима националног значаја (M64)

1. **Lukić I**, Inić-Kanada A, Stein E, Marinković E, Filipović A, Đokić R, Kosanović D, Schuerer N, Ghasemian E, Barisani-Asenbauer T, Stojanović M. Uloga heterologe imunosti u otpornosti ka hlamidijalnim infekcijama. *Svetski dan imunologije 2017*, Beograd, 27. април 2017. године
2. **Lukić I**, Inić-Kanada A, Stein E, Marinković E, Filipović A, Đokić R, Barisani-Asenbauer T, Stojanović M. The role of heterologous immunity in resistance to ocular chlamydial infection. *Serbian Biochemical Society – 7th conference with international participation*, Beograd, 10. новембар 2017. године, Proceedings p151-153

Д. Закључак

Увидом у докторску дисертацију **Иване Д. Лукић** под насловом “**Терапеутски потенцијал анти-тетанус токсид моноклонских антитела: примена заснована на везивним карактеристикама**“, Комисија је закључила да је истраживање у оквиру дисертације засновано на савременим сазнањима, спроведено у складу са свим начелима научно-истраживачког рада и коришћењем одговарајуће савремене методологије. Постављени циљеви истраживања су успешно реализовани, добијени резултати су прегледно приказани и веома добро и критички продискутовани. Комисија сматра да докторска дисертација Иване Лукић представља значајан допринос истраживањима која се односе на примену моноклонских антитела у третману интоксикације тетанусом, као и истраживањима која су усмерена на хетерологе ефекте имунизације против тетануса.

Резултати докторске дисертације Иване Лукић публиковани су у врхунском међународном часопису (M21) *Vaccine* и истакнутом међународном часопису (M22) *Toxicon*, и презентовани на три међународна скупа и два скупа националног значаја.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да прихвати докторску дисертацију Иване Д. Лукић и одобри њену јавну одбрану.

КОМИСИЈА:

др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор,
Хемијски факултет Универзитета у Београду

др Маријана Стојановић, виши научни сарадник,
Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“

др Радивоје Продановић, ванредни професор,
Хемијски факултет Универзитета у Београду

У Београду, 11.06.2018. године.