

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Зоране Д. Лопандић, мастер биохемичара.

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду одржаној 15. 01. 2026. године, одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Зоране Д. Лопандић, мастер биохемичара, асистента Медицинског факултета Универзитета у Београду, под насловом:

„Испитивање терапеутског ефекта H1sD2 химере и њених гликоформи на модулацију имунског одговора код алергије на кућну прашину“.

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је прихватило тему докторске дисертације на седници одржаној 25. новембра 2021. године у Београду, одлука број 61206-4640/2-21.

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

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Зоране Д. Лопандић написана је на српском језику на 143 стране, А4 формата, фонт Times New Roman, величина слова 12, проред 1.0, маргине 2 cm. Докторска дисертација садржи 52 слике и 53 табеле. Дисертација се састоји из 8 поглавља: Увод (2 стране), Теоријски део (34 стране), Циљеви (2 стране), Наши радови (37 страна), Дискусија (5 страна), Закључак (2 стране), Материјал и методе (31 страна), Литература (13 страна, 201 цитат). Поред наведеног, дисертација садржи и насловне стране на српском и енглеском језику, информације о ментору и члановима комисије, Захвалницу на српском језику (2 стране), Сажетак на српском и енглеском језику (по 1 страна), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (3 стране), Биографију кандидата на српском језику (1 страна), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истовестности (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

Увод садржи опис предмета истраживања и осврт на актуелна истраживања која су од значаја за ову докторску дисертацију. Описан је проблем алергија, са посебним акцентом на инхалаторне алергене, као што су гриња кућне прашине (ХДМ). Такође, наглашен је и значај алерген-специфичне имунотерапије (АИТ), са акцентом на важности адјуванса у њеном унапређењу. Такође, објашњен је значај самих гликана, као и гликопротеина вируса грипа хемаглутинаина као потенцијалног адјуванса у АИТ.

Теоријски део је подељен на шест целина. Прва целина, под насловом **Алергије**, објашњава сам термин алергије и алергена и даје кратак преглед о самој патогенези алергија. Друга целина, **Особине алергијске инфламације**, даје детаљан преглед патологије алергијске болести, са освртом на учесталост и фазе алергијске реакције, као и најчешће алергене. Највећа пажња је посвећена инхалаторним алергеним, са посебним освртом на главни алерген гриња кућне прашине, Der p 2. Трећа целина, **Третман алергијских болести**, објашњава терапијски приступ у лечењу алергија, где се говори о традиционалној фармакотерапији, примени биолошке терапије, као и о алерген-специфичној имунотерапији (АИТ) као једином дугорочном решењу. У четвртој целини, **Нове стратегије имунотерапије**, описан је значај имуномодулаторних агенаса, као што су алергоиди и рекомбинантни алергени. Посебно је указано на значај адјувана који појачавају ефикасност терапеутика у АИТ. Такође, наглашена је и улога гликана у имунском одговору, као и ефекат гликопротеина вируса на имунски одговор. Пета целина, **Хемаглутинин као адјуванс у АИТ**, описује овај протеин и његову структуру, са посебним нагласком на угљенохидратне компоненте којима је овај протеин декорисан и њихов утицај на модулацију имунског одговора. Шеста целина, **Модели у алерген-специфичној имунотерапији**, говори о различитим моделима који се користе у испитивањима механизма алергијске толеранције и развоја нових приступа у лечењу алергија. У овој целини су описани животињски модели, као и *in vitro* модел ћелијске линије THP-1, као модел система за тестирање потенцијалних терапеутика. Седма целина, **Квасци као домаћини за производњу протеинских терапеутика**, даје преглед значаја рекомбинантних протеинских терапеутика и хетерологне производње, са посебним освртом на различите експресионе системе и њихове предности и ограничења. Посебна пажња посвећена је квасцу *Pichia pastoris* као ефикасном и широко примењивом експресионом систему за производњу рекомбинантних протеина и вакцина, укључујући његове молекуларне, биотехнолошке и гликозилационе карактеристике.

У поглављу **Циљеви** наведени су основни циљеви ове докторске дисертације, као и приказ конкретних задатака неопходних за њихову реализацију. Главни циљ ове дисертације јесте сама производња, а затим и испитивање имуномодулаторног потенцијала H1sD2 гликопротеина, као и утицаја N-гликана хемаглутинаина као адјуванса на имунски одговор.

У поглављу **Наши радови** приказани су резултати остварени током израде ове докторске дисертације.

- ***In silico* дизајн H1sD2 генских конструктора и провера плаزمиди:** Представљен је дизајн генских конструктора (Der p 2 и H1sD2), као и поступак њиховог умножавања, пречишћавања и провере.
- **Експресија и пречишћавање протеина:** Приказани су резултати експресије Der p 2 алергена и H1sD2 гликопротеина, као и њиховог пречишћавања.
- **Анализа протеина масеном спектрометријом:** Представљена је детаљна анализа Der p 2 и H1sD2 гликопротеина која је рађена масеном спектрометријом.
- **IgE реактивност Der p 2 и H1sD2 протеина:** Описани су резултати везивања IgE антитела из серума пацијената алергичних на гриње кућне прашине за Der p 2 и H1sD2 протеине.

- **Испитивање везивања H1sD2 гликопротеина за рецепторе на површини THP-1 макрофага:** Описани су резултати везивања флуоресцентно обележених Der p 2 и H1sD2 протеина за површинске рецепторе на THP-1 макрофагима, са посебним акцентом на DC-SIGN манозни рецептор.
- **Испитивање имуномодулаторног ефекта H1sD2 гликопротеина:** У овој целини су приказани резултати добијени након анализе генске експресије и анализе секретованих цитокина након третмана THP-1 макрофага и мононуклеарних ћелија периферне крви (PBMC) пацијената алергичних на гриње кућне прашине.
- **Развој протокола имунизације код C57BL/6 и BALB/c мишева:** У овој целини је детаљно описан развој протокола имунизације код два соја мишева, BALB/c и C57BL/6, као и одговор изолованих спленоцита након имунизације на третман Der p 2 и H1sD2 протеинима. Иmunски утицај ових протеина на спленоците је проверен анализом секретованих цитокина након стимулације.

Поглавље **Дискусија** критички разматра резултате проистекле из ове дисертације и позиционира их у контексту доступних података из литературе. Упоредном анализом доступних експерименталних и литературних података потврђене су или оповргнуте иницијалне хипотезе и претпостављена су објашњења описаних феномена.

Закључак даје кратак преглед резултата ове докторске студије и одговора на питања формулисана у оквиру циљева ове дисертације.

Материјал и методе садрже детаљан опис опреме, реагенса, узорака као и експерименталних метода и процедура коришћених у овој докторској дисертацији.

Б. Кратак приказ резултата

У овој докторској дисертацији испитиван је имуномодулаторни ефекат 5 различитих H1sD2 гликопротеина: WT, M1, M2, M3 и M4. Ови протеини представљају рекомбинантне химере састављене од рецептор везујућег домена хемаглутинаина (H1) и главног алергена гриња кућне прашине, Der p 2. H1 је гликопротеин вируса грипа који је одговоран за улазак вируса у ћелију и представља један од главних антигена овог вируса. Сам фокус ове дисертације је анализа утицаја N-гликана на хемаглутининову на имунски одговор са циљем да се процени њихова примена у улози адјуванаса за унапређење АИТ. Коришћењем *in silico* метода, дизајнирани су H1sD2 генски конструкти где су у оквиру RBD домена увођена различита гликозилациона места - N43, N81, N111 и N116, која су различито комбинована у оквиру гликоформи. WT гликоформа је дизајнирана тако да садржи само високо конзервирано N43 гликозилационо место, док M1, M2 и M3 гликоформе поседују по још једно гликозилационо место, N111, N116 и N81. На крају, у M4 гликоформи су уведена сва четири N-гликозилациона места. Такође, коришћењем AlphaFold 3 сервера су дизајнирани 3D структурни модели H1sD2 гликоформи са гликанима од 8 угљенохидратних јединица. Употребом рекомбинантне ДНК технологије произведени су сви гликопротеини коришћењем *Pichia pastoris* експресионог система. Сви протеини су секретовани у ванћелијски медијум, а одатле су пречишћени применом хроматографских техника. Масеном спектрометријом (LC-MS/MS) су мапирани пептиди и секвенцирана је примарна структура протеина где је потврђена висока покривеност

аминокиселинске секвенце. Такође, анализа интактних протеина и гликопептида је потврдила да су сва уведена гликозилациона места успешно гликозилована и да гликани садрже 8 до 15 манозних јединица.

Коришћењем серума пацијената алергичних на гриње кућне прашине у имуноблоту је потврђено да су сви H1sD2 гликопротеини у оквиру своје структуре задржали IgE епитопе и реактивност која потиче од Der p 2 алергена. Како би се даље испитао имуномодулаторни утицај, као модел систем коришћени су THP-1 моноцити који су диференцирани у макрофаге. Диференцијација је постигнута коришћењем форбол-12-миристат-12 ацетата (PMA) за добијање M0 фенотипа и PMA + IL-4 за добијање M2 фенотипа макрофага. Диференцирани макрофаги су детаљно окарактерисани проточном цитометријом, где су поред разлике у величини и грануларности, потврђене и разлике у експресији површинских маркера - CD54, CD163 и CD206. Успешно диференцирани M0 и M2 макрофаги су коришћени за испитивање везивања гликопротеина за површинске рецепторе који препознају образац. Суптилне разлике у везивању H1sD2 гликопротеини за површину макрофага је потврђено проточном цитометријом, након што су ћелије третиране протеинима који су обележени FITC-ом. Профил везивања за M0 и M2 фенотип макрофага је био исти, док је удео FITC позитивних ћелија био већи након третирања M2 фенотипа. Такође, третирањем M2 макрофага FITC обележеним протеинима уз додатак анти-DC-SIGN-PerCP-Cy5.5 антитела је конфокалном микроскопијом потврђено везивање гликопротеина за маноза-специфични DC-SIGN рецептор.

Како би се испитао имуномодулаторни утицај, THP-1 макрофаги су третирани Der p 2 алергеном и H1sD2 гликопротеинима. Урађена је анализа експримираних гена за про- и анти-инфламаторне цитокине (IL-4, IL-10 и IFN- γ). Генска експресија IFN- γ је била најјача након третмана са M2 и WT гликоформама, док је појачана експресија гена за IL-10 детектована након третмана са WT и M1. Са друге стране, једини значајан пораст за IL-4 је детектован након третмана са Der p 2. Такође, приказ односа IFN- γ и IL-4 указује на то да се најзначајније статистичке разлике виде након третмана са WT и M2 гликоформама. Поред THP-1 макрофага, мононуклеарне ћелије периферне крви (PBMC) пацијената алергичних на гриње кућне прашине су третиране Der p 2 алергеном и H1sD2 гликопротеинима. Након изоловања PBMC из пуне крви, ћелије су третиране протеинима, а затим је праћена експресија цитокина ELISA тестом. Резултати ове студије су показали да је ниво IL-4 цитокина низак код свих узорака, док су са друге стране сви гликопротеини изазвали повећану секрецију регулаторног IL-10 цитокина. Такође, до статистички значајне разлике у нивоу секреције IFN- γ и односу IFN- γ /IL-4 су довели WT, M1 и M2 гликопротеини. Финално, на основу ових резултата се може закључити да се M2 гликоформа издваја као најбољи кандидат за примену у АИТ.

Додатно, у оквиру ове дисертације је развијен и оптимизован протокол имунизације код C57BL/6 и BALB/c мишева, који је омогућио анализу раног и локалног имунског одговора на Der p 2 алерген и ХДМ екстракт. Резултати су потврдили да имунски одговор значајно зависи од генетске позадине соја и начина апликације антигена. C57BL/6 мишеви су показали израженију продукцију IgG1, еозинофилну инфилтрацију и активацију Th2 одговора, док су BALB/c мишеви показали доминантнију продукцију IgG2a, неутрофилну инфилтрацију и мешовити, нешто слабији Th2 одговор. Ови

резултати потврђују комплексност имунске поларизације и оправдавају употребу оба соја у моделима алергије и АИТ. У наставку израде ове дисертације коришћени су развијени протоколи, тачније, након имунизације су изоловани спленоцити и третирани Der p 2 алергеном и H1sD2 гликопротеинима. Након третмана праћена је секреција различитих про- и анти-инфламаторних цитокина: IL-4, IL-10 и IFN- γ . H1sD2 гликоформе су показале изражен имуномодулаторни потенцијал, посебно кроз индукцију IL-10 и IFN- γ , уз ограничену Th2 реактивност код C57BL/6 и комплекснији цитокински одговор код BALB/c мишева. Повећан однос IFN- γ /IL-4 указао је на померање имунског одговора ка Th1/регулаторном профилу, нарочито након третмана WT и M2 гликоформама, што потврђује њихов потенцијал за примену у алерген-специфичној имуноterapiји.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Око 30% светске популације пати од алергија, које представљају хроничне инфламаторне болести настале услед неадекватног имунског одговора на алергене [1,2]. Према подацима Светске здравствене организације (СЗО), приближно 600 милиона људи болује од алергијског ринитиса, док око 200 милиона има астму. Због високе преваленције и значајног утицаја на квалитет живота, алергије су од стране СЗО сврстане међу три најважнија поремећаја које је неопходно спречавати и контролисати у 21. веку [3].

Један од главних извора инхалаторних алергена широм света јесу гриње кућне прашине. Ови алергени су чест узрок алергијског ринитиса и астме, при чему је *Dermatophagoides pteronyssinus* најзначајнија врста, а Der p 2 један од клинички најважнијих алергена [4]. Алерген-специфична имуноtherapiја (АИТ) представља једини терапијски приступ који има дугорочан утицај на ток алергијских обољења, јер доводи до модификације имунског одговора на алергене. Деловање АИТ огледа се у смањењу запаљења кроз промене ћелијског и хуморалног имунског одговора при контакту са алергеном, при чему долази до постепене десензитизације мастоцита и базофила и смањења преосетљивости током времена [2,5]. Ова терапија смањује активацију алерген-специфичних Th2 ћелија, подстиче развој регулаторних Т и В ћелија и индукцију блокирајућих IgG и IgA антитела [6]. Унапређење постојећих АИТ стратегија представља предмет бројних истраживања, при чему се као перспективан приступ издваја примена пречишћених, високо имуногених препарата у комбинацији са новим адјувансима [7]. Улога адјуванаса у АИТ је да преусмери имунски одговор са Th2 профила ка Th1/Th2 одговору, чиме се постиже имунолошка равнотежа. Као адјуванси у имуноtherapiји могу се користити стимулатори урођене имуности, алуминијум-хидроксид, лиганди TLR (eng. *Toll-like receptor*), С-тип лектини, као и вирусне честице [4]. Гликани вируса, осим што модулишу адаптивни имунски одговор, имају значајну улогу у активацији урођене имуности посредством рецептора који препознају обрасце (PRR, eng. *Pattern Recognition Receptors*).

Хемаглутинин (H1) је гликопротеин омотача вируса грипа који посредује у везивању вируса за ћелију и индукцији Th1 имунског одговора. Због ових особина, хемаглутинин се сматра перспективним кандидатом за примену у модулацији имунског одговора као адјуванс. Његов рецептор-везујући домен (RBD) показује велики потенцијал као нови

адјуванс за АИТ [8]. Ипак, пошто је вирус грипа подложен честим мутацијама, оне често укључују и промене у гликозилацији хемаглутинаина које могу бити препознате од стране рецептора урођеног имунитета, укључујући лектинске рецепторе као што су MBL (маноза-везујући лектин), MMR (макрофагни манозни рецептор), MGL (макрофагни галактозни тип лектина) и DC-SIGN (*eng Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) [9].

Како би се испитао имуномодулаторни утицај различитих N-гликана у оквиру H1, у овој докторској дисертацији су дизајниране и произведене различите гликоформе које су сачињене од Der p 2 алергена и RBD-H1. Пет H1sD2 гликоформи, WT, M1, M2, M3 и M4, су дизајниране *in silico* тако што су уведена различита места гликозилације у оквиру H1домена (N43 у WT, N43 и N111 у M1, N43 и N116 у M2, N43 и N81 у M3, а у M4 су уведена сва наведена места). Све гликоформе су произведене у *P. pastoris* експресионом систему, који се веома често користи за продукцију рекомбинантних гликопротеина због своје способности да уводи N-гликане [10]. Након пречишћавања, сви протеини су окарактерисани биохемијским и имунолошким методама. Протеини су детаљно окарактерисани масеном спектрометријом, којом је недвосмислено потврђена очекивана примарна структура, као и присуство, позиција и хетерогеност N- везаних гликана на уведеним гликозилационим местима. У имуноблоту коришћењем серума пацијената алергичних на гриње кућне прашине је потврђена IgE реактивност гликоформи, што указује на очувану алергеност и присуство релевантних епитопа [11]. С обзиром на то да манозилувани протеини могу специфично интераговати са C-типом лектинских рецептора на ћелијама урођене имуности [12], испитивана је њихова способност везивања за различите фенотипове макрофага. Везивања флуоресцентно обележених Der p 2 и H1sD2 протеина за M0 и M2 THP-1 макрофаге је анализирано проточном цитометријом где је уочено израженије везивање за M2 фенотип. Овај резултат је у складу са литературом, с обзиром да M2 макрофаги на својој површини исказује већи број манозних рецептора [13]. Конфокалном микроскопијом је додатно потврђено да везивање иде преко DC-SIGN манозног рецептора, што је у складу са подацима из литературе [14]. При процени имуномодулаторног потенцијала протеина намењених за примену у алерген-специфичној имунотерапији анализира се профил цитокина који одражава промене у имунском одговору. Посебан значај имају Th2 цитокини (IL-4, IL-5 и IL-13), који су кључни медијатори алергијске инфламације, као и Th1 и регулаторни цитокини (IFN- γ и IL-10), чија индукција указује на померање имунског одговора ка протективном фенотипу [2,15]. Систематска анализа ових цитокина представља важан параметар за процену ефикасности, безбедности и терапијског потенцијала нових кандидата за АИТ. Како би се испитао имуномодулаторни ефекат, као модел систем коришћени су THP-1 макрофаги и PBMC изоловани из пуне крви пацијената алергичних на гриње кућне прашине. Анализа генске експресије у THP-1 макрофагима након стимулације је показала да су M2 и WT гликоформе највише индуковале IFN- γ , а WT и M1 гликоформе IL-10, указујући на различите имуномодулаторне особине гликопротеина. Сама секреција IL-10 је значајна из разлога што доводи до смањења Th2 активност, инхибира продукцију IgE антитела и смањује упалу у ткивима, чиме промовише дугорочну имунотерапијску толеранцију [2], док IFN- γ , као Th1 цитокин, делује антагонистички на Th2 сигнализацију, померајући имунски одговор ка заштитном Th1/регулаторном одговору, што смањује алергијску реакцију [16]. Секреција ових цитокина је додатно анализирана након стимулације изолованих PBMC, где су се међу

H1sD2 гликоформама издвојиле WT и M2 химере, како на основу повећаног нивоа секреције IL-10, тако и на основу повећаног односа концентрација IFN- γ /IL-4. Ови резултати су посебно значајни јер РВМС као модел систем дају веродостојније резултате у односу на ТНР-1 макрофаге из разлога што садрже природне лимфоците и моноците који одражавају физиолошки имунски статус појединца и на тај начин омогућавају интеракцију више ћелијских типова и производњу цитокина у природном односу, што боље симулира људски имунски одговор [17]. Како би се додатно допунила испитивања имуномодулаторног ефекта H1sD2 гликопротеина, коришћени су BALB/c и C57BL/6 мишији модели, који представљају уобичајене експерименталне моделе за проучавање Th1/Th2 баланса и имунске реактивности и алергијских модела [18]. Ова два соја показују различит одговор на различите алергене. BALB/c мишеви показују склоност ка Th2 имунском одговору, док C57BL/6 мишеви имају тенденцију ка Th1 профилу, што омогућава анализу специфичних имунских реакција на различите антигене код различитих сојева [18,19]. Првобитно је развијен и оптимизован протокол имунизације, при чему су резултати показали да C57BL/6 мишеви развијају израженију продукцију IgG, IgG1 и IgE антитела, еозинофилну инфилтрацију и снажан Th2 имунски одговор, док BALB/c мишеви испољавају доминантнију IgG2a продукцију, неутрофилну инфилтрацију и релативно слабији Th2 одговор. Иако се у класичној литератури C57BL/6 сој описује као Th1-доминантан, а BALB/c као Th2-доминантан сој [19], добијени резултати су у складу са бројним студијама које показују да имунска поларизација ових сојева значајно зависи од природе алергена, дозе и пута апликације, посебно у моделима алергијске астме [20,21]. Након развоја протокола, анализе секретованих цитокина су спроведене на изолованим спленоцитима из имунизованих BALB/c и C57BL/6 мишева, чиме су додатно потврђени претходно добијени резултати да H1sD2 гликоформе, посебно WT и M2, имају снажан имуномодулаторни потенцијал, да подстичу Th1 и регулаторне механизме кроз индукцију IL-10 и IFN- γ , уз ограничену Th2 реактивност, чиме показују обећавајући профил за примену у алерген-специфичној имунотерапији.

Референце:

1. Akdis, C.A. Does the Epithelial Barrier Hypothesis Explain the Increase in Allergy, Autoimmunity and Other Chronic Conditions? *Nat Rev Immunol* 2021, 21, 739–751, doi:10.1038/s41577-021-00538-7.
2. Durham, S.R.; Shamji, M.H. Allergen Immunotherapy: Past, Present and Future. *Nat Rev Immunol* 2023, 23, 317–328, doi:10.1038/s41577-022-00786-1.
3. Wang, J.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Hu, L.; Liu, J.; Wang, L.; Wang, T.; Zhang, H.; Cong, L.; Wang, Q. Pathogenesis of Allergic Diseases and Implications for Therapeutic Interventions. *Signal Transduct Target Ther* 2023, 8, 138, doi:10.1038/s41392-023-01344-4.
4. Huang, H.J.; Sarzsinszky, E.; Vrtala, S. House Dust Mite Allergy: The Importance of House Dust Mite Allergens for Diagnosis and Immunotherapy. *Mol Immunol* 2023, 158, 54–67, doi:10.1016/j.molimm.2023.04.008.
5. Zubeldia, J.M.; Ferrer, M.; Dávila, I.; Justicia, J.L. Adjuvants in Allergen-Specific Immunotherapy: Modulating and Enhancing the Immune Response. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2019, 29, 103–111, doi:10.18176/jiaci.0349.

6. Gurgel, R.K.; Baroody, F.M.; Damask, C.C.; Mims, J. “Whit”; Ishman, S.L.; Baker, D.P.; Contrera, K.J.; Farid, F.S.; Fornadley, J.A.; Gardner, D.D.; et al. Clinical Practice Guideline: Immunotherapy for Inhalant Allergy. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 2024, *170*, S1–S42, doi:10.1002/ohn.648.
7. Sokolowska, M.; Boonpiyathad, T.; Escribese, M.M.; Barber, D. Allergen-Specific Immunotherapy: Power of Adjuvants and Novel Predictive Biomarkers. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2019, *74*, 2061–2063, doi:10.1111/all.13973.
8. Kanekiyo, M.; Graham, B.S. Next-Generation Influenza Vaccines. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2021, *11*, 1–18, doi:10.1101/cshperspect.a038448.
9. York, I.A.; Stevens, J.; Alymova, I. V. Influenza Virus N-Linked Glycosylation and Innate Immunity. *Biosci Rep* 2019, *39*, 1–15, doi:10.1042/BSR20171505.
10. Cereghino, J.L.; Cregg, J.M. Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 2000, *24*, 45–66, doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x.
11. Jin, H.S.; Yong, T.S.; Park, J.W.; Hong, C.S.; Oh, S.H. Immune Reactivity of Recombinant Group 2 Allergens of House Dust Mite, *Dermatophagoides Pteronyssinus*, and *Dermatophagoides Farinae*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2003, *13*, 36–42.
12. Baum, L.G.; Cobb, B.A. The Direct and Indirect Effects of Glycans on Immune Function. *Glycobiology* 2017, *27*, 619–624, doi:10.1093/glycob/cwx036.
13. Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The Chemokine System in Diverse Forms of Macrophage Activation and Polarization. *Trends Immunol* 2004, *25*, 677–686.
14. Yang, Z.-S.; Wang, W.-H.; Lin, Y.-T.; Lin, C.-Y.; Urbina, A.N.; Thitithanyanont, A.; Lu, P.-L.; Chen, Y.-H.; Wang, S.-F. DC-SIGN and Galectin-3 Individually and Collaboratively Regulate H5N1 and H7N9 Avian Influenza Virus Infection via Interaction with Viral Envelope Hemagglutinin Protein. *Glycobiology* 2022, 311–324, doi:10.1093/glycob/cwac078.
15. Akdis, C.A.; Akdis, M. Mechanisms of Immune Tolerance to Allergens: Role of IL-10 and Tregs. *J Clin Invest* 2014, *124*, 4678–4680, doi:10.1172/JCI78891.
16. Pavón-Romero, G.F.; Parra-Vargas, M.I.; Ramírez-Jiménez, F.; Melgoza-Ruiz, E.; Serrano-Pérez, N.H.; Teran, L.M. Allergen Immunotherapy: Current and Future Trends. *Cells* 2022, *11*, 212, doi:10.3390/cells11020212.
17. Ganeshpurkar, A.; Saluja, A.K. Experimental Animal Models Used for Evaluation of Potential Immunomodulators: A Mini Review. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* 2017, *55*, 211–216, doi:10.1016/j.bfopcu.2017.08.002.
18. Gorska, M.M. Mouse Models of Asthma. *Methods in Molecular Biology* 2018, *1809*, 351–362, doi:10.1007/978-1-4939-8570-8_23.
19. Watanabe, H.; Numata, K.; Ito, T.; Takagi, K.; Matsukawa, A. Innate Immune Response in Th1- and Th2-Dominant Mouse Strains. *Shock* 2004, *22*, 460–466, doi:10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9.
20. Chang, Y.-S.; Kim, Y.-K.; Jeon, S.G.; Kim, S.-H.; Kim, S.-S.; Park, H.-W.; Min, K.-U.; Kim, Y.-Y.; Cho, S.-H. Influence of the Adjuvants and Genetic Background on the Asthma Model Using Recombinant Der f 2 in Mice. *Immune Netw* 2013, *13*, doi:10.4110/in.2013.13.6.295.

21. Hove, C.L. Van; Maes, T.; Cataldo, D.D.; Guéders, M.M.; Palmans, E.; Joos, G.F.; Tournoy, K.G. Comparison of Acute Inflammatory and Chronic Structural Asthma-like Responses between C57BL/6 and BALB/c Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2009, *149*, doi:10.1159/000199715.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације

1) Радови

Рад у врхунском међународном часописима (M21)

- Lopandić, Z.; Babović, M.; Ravnsborg, T.; Atanasković-Marković, M.; Jensen, O.N.; Gavrović-Jankulović, M. Hybrid Adjuvant-Allergen H1sD2 Proteoforms Enhance Innate Immunity Activation via Distinct N-Glycosylation Profiles. *Cells* **2025**, *14*, 2008, <https://doi.org/10.3390/cells14242008>

Истакнути часописи међународног значаја (M22):

- Lopandić, Z.; Dragačević, L.; Kosanović, D.; Burazer, L.; Gavrović-Jankulović, M.; Minić, R. Differences in Mouse Strains Determine the Outcome of Der p 2 Allergy Induction Protocols. *J Immunol Methods* **2022**, *511*, 113382, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113382>

2) Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

1. **Lopandić Z**, Babović M, Atanasković-Marković M, Nørregaard Jensen O, Gavrović-Jankulović M; „Biochemical characterization of newly designed H1sD2 glycoforms as potential therapeutics for HDM allergy“, Book of Abstracts of the XI Conference of the Serbian Biochemical Society: “Amazing Biochemistry”, p. 121, 22-23 September 2022, Novi Sad, Serbia.
2. **Lopandić Z**, Kosanović D, Dragačević L, Burazer L, Gavrović-Jankulović M, Minić R; „Distinct profiles of allergic inflammation induced by Der p 2 allergen in BALB/c and C57BL/6 mice“, IUBMB–FEBS–PABMB Congress - The Biochemistry Global Summit, P03.0-005, 9-14 July 2022, Lisbon, Portugal.
3. **Lopandić Z.**, Babović M., Nørregaard Jensen O., Gavrović-Jankulović M.; „Biochemical characterization and immunomodulatory effect of newly designed H1sD2 glycoproteins“, 47th FEBS Congress – Together in bioscience for a better future, P-08.2-72, 8–12 July 2023, Tours, France.
4. **Lopandić Z.**, Gavrović-Jankulović M.; „Analysis of newly designed H1sD2 glycoproteins by bioinformatic tools“, Book of Abstracts of the XII Conference of the Serbian Biochemical Society: Biochemistry in Biotechnology”, p. 101, 21-23 September 2023, Belgrade, Serbia.
5. **Lopandić Z**, Babović M, Nørregaard Jensen O, Gavrović-Jankulović M.; „Different H1sD2 glycoforms influence the cytokine gene expression in THP-1 differentiated macrophages“, 48th FEBS Congress – Mining biochemistry for human health and well-being, P-31-023, 29 June–3 July 2024, Milano, Italy.
6. **Lopandić Z**, Babović M, Ravnsborg T., Atanasković-Marković M., Nørregaard Jensen O, Gavrović-Jankulović M.; „Modulation of the immune response by N-glycans in an H1sD2

glycoprotein model for allergen-specific immunotherapy“, 49th FEBS Congress – Bridging Continents to Advance Life Science, P-37-015, 5–9 July 2025, Istanbul, Turkey

7. **Lopandić Z**, Dragačević L, Minić R, Živković I, Atanasković-Marković M, Gavrović-Jankulović M.; „Glycoengineered H1sD2 as a Novel Immunomodulatory Agent for Enhancing Allergen-Specific Immunotherapy“, FEBS3+ Meeting, 24-27 September 2025, Belgrade, Serbia

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.) и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације под насловом „Испитивање терапеутског ефекта H1sD2 химере и њених гликоформи на модулацију имунског одговора код алергије на кућну прашину“, аутора Зоране Д. Лопандић, констатујемо да утврђено подударање текста износи 15%. Овај степен подударности последица је универзалних скраћеница, назива једињења, цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом ове дисертације као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације што је у складу са чланом 9. овог Правилника.

Због свега наведеног, сматрамо да је докторска дисертација Зоране Д. Лопандић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

На основу приказаних података и резултата, Комисија је закључила да је у поднетој дисертацији под насловом „Испитивање терапеутског ефекта H1sD2 химере и њених гликоформи на модулацију имунског одговора код алергије на кућну прашину“ кандидаткиња Зорана Д. Лопандић успешно одговорила на задате циљеве у оквиру којих је произвела у *P. pastoris* експресионом систему H1sD2 химерни гликопротеин, као и његове четири гликоформе. Протеине је окарактерисала инструменталним и биохемијским методама, где је потврдила њихову молекулску масу, аминокиселинску секвенцу, као и гликозилациони профил. IgE реактивност произведених протеина је потврдила у имуноблоту коришћењем серума пацијената алергичних на гриње кућне прашине. Такође, кандидаткиња је испитивала имуномодулаторни ефекат рекомбинантних H1sD2 гликопротеина на макрофагима диференцираним из THP-1 моноцитне ћелијске линије, као и на моноклеарним ћелијама периферне крви пацијената алергичних на гриње кућне прашине. Поред тога, у овој докторској дисертацији је успешно развијен и оптимизован протокол имунизације код C57BL/6 и BALB/c мишева, чији су *ex vivo* спленоцити коришћени за финално испитивање имуномодулаторног ефекта гликопротеина. Након свеобухватне анализе имуномодулаторног ефекта рекомбинантних H1sD2 гликопротеина у различитим модел системима (THP-1 макрофаги, моноклеарне ћелије периферне крви пацијената алергичних на гриње кућне прашине и мишији спленоцити), закључено је да H1sD2 гликопротеини заиста показују терапијски потенцијал у контексту алерген-специфичне

имунотерапије, а као најбољи кандидати су се издвојиле WT и M2 гликоформе које индукују секрецију IL-10 и IFN- γ .

Резултати научно-истраживачког рада су објављени у два научна рада категорије M22 и M21. Поред тога, резултати овог рада су саопштени на седам скупова међународног значаја. На основу изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Зоране Д. Лопандић, под насловом „Испитивање терапеутског ефекта H1sD2 химере и њених гликоформи на модулацију имунског одговора код алергије на кућну прашину“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду, 23. 01. 2026. године

Комисија:

Др Радивоје Продановић
Редовни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

Др Милица Поповић
Ванредни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

Др Рајна Минић
Научни саветник
Институт за вирусологију, вакцине и серуме “Торлак“, Београд