

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
HEMIJSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj **17.1.2013.** godine, izabrani smo u Komisiju za ocenu i odbranu doktorske disertacije Luke Mihajlović, master biohemičara, pod naslovom:

„Efekti polifenolnih molekula i fenol oksidaza na strukturu i imunološka svojstva alergena“

Na osnovu pregledane disertacije Nastavno-naučnom veću podnosimo sledeći

I Z V E Š T A J

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Luke Mihajlović napisana je na 75 strana i sastoji se iz sledećih delova: **Uvod** (2 strane), **Opšti deo** (7 strana), **Analize fenolnog sastava**(27 strana), **Enzimsko umrežavanje proteina kikirikija** (13 strana), **Komparativna analiza proteoma polena *A. artemisiifolia* i subpolenskih čestica** (5 strana), **Zaključci** (1 strana), **Literatura** (8 strana sa 114 literaturnih citata) Pored toga rad sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica, sadržaj i biografiju. U radu se nalazi 17 slika i 13 tabela.

U **Uvodu** je dat osvrt na najbitnije teme koje ova doktorske disertacija obradjuje.

U **Opštem delu** su izneti osnovni podaci o alergijama i mehanizmima alergijskih reakcija. Poglavlje opisuje i daje osnovne informacije i o lakazi i polifenolnim molekulima.

Poglavlje **Analize fenolnog sastava** se sastoji od 4 podteme koje obradjuju analizu sastava fenolnih jedinjenja iz različitih izvora: Fenolni sastav polena i subpolenskih čestica *Ambrosia artemisiifolia*, Fenolni sastav lakazom tretiranog ekstrakta kikirikija, Fenolni sastav zelenog čaja, Fenolni sastav kore jabuke. Osim razvijanja ekstrakcionih procedura, poglavlje obradjuje i dejstvo enzima lakaze na fenolni sastav ispitivanih izvora. Svaka od 4 celine sadrži se sastoji iz četiri celine: uvodnog dela specifičnog za dato poglavlje, materijala i metoda, rezultata i diskusije Rezultati su obrazloženi u diskusiji i upoređeni sa podacima iz literature.

Poglavlje **Enzimsko umrežavanje proteina kikirikija** obradjuje optimizaciju procesa enzimskog umrežavanja lakazom, kao i ispitivanje umreženih proizvoda. Poglavlje je organizovano u dve celine, od kojih se svaka sastoji od uvodnog dela specifičnog za dato poglavlje, materijala i metoda, rezultata i diskusije. Postupak umrežavanja je optimizovan variranjem reakcionih uslova, a dobijeni proizvodi su ispitivani SDS-PAGE elektroforezom, elektronskom mikroskopijom i CD spektrometrijom. Ispitivane su promene u IgE vezivanju, kao i bioraspoloživost u Caco-2 model sistemu. Rezultati su obrazloženi u diskusiji i upoređeni sa podacima iz literature.

Poglavlje **Komparativna analiza proteoma polena *A. artemisiifolia* i subpolenskih čestica** se sastoji od uvodnog dela specifičnog za dato poglavlje, materijala i metoda, rezultata i diskusije. Poglavlje obradjuje komparaciju ekstrakta proteina polena *A. artemisiifolia*, ekstrakta subpolenskih čestica *A. artemisiifolia* i standardnog dijagnostičkog ekstrakta istog izvora. Opisan je „shotgun“ proteomički pristup koji je korišćen pri analizi, kao i 2D SDS-PAGE. Rezultati su obrazloženi u diskusiji i upoređeni sa podacima iz literature.

U okviru odeljka **Zaključci** ukratko su izloženi dobijeni rezultati i iznet je njihov značaj.

Literatura sadrži 114 literaturnih navoda prema abecednom redosledu prezimena autora.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Razvijen je novi metod za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz polena, koji omogućava otklanjanje peptidnih molekula iz uzorka. Metod je od posebnog interesa pri pripremanju uzoraka za eksperimente *in vivo*. Ispitani efekti lakaze na fenolna jedinjenja iz jabuke i zelenog čaja pokazuju selektivnost dejstva ovog enzima, pri čemu su pojedine klase fenolnih jedinjenja značajno reaktivnije.

Razvijen je optimizovan metod za izdvajanje subpolenskih čestica polena *A. artemisiifolia*. Po prvi put je opisan fenolni sastav subpolenskih čestica bilo koje biljne vrste, kao i fenolni sastav polena ambrozije. Ustanovljeno je da su glavne fenolne komponente polena ambrozije mono i malonil mono-glukozidi kvercetina, kampferola i izoramnetina, uz prisustvo malih količina di- i tri-glikozida ovih aglikona. Osim ovih jedinjenja, detektovani su i derivati sperimidina. Sastav subpolenskih čestica je siromašniji višim glukozidima, dok su derivati sperimidina prisutni.

Optimizovan je metod za umrežavanje proteina kikirikija dejstvom lakaze, koji je iskorišćen za sintezu umreženih proizvoda.

Detaljno su okarakterisani proteinski i fenolni proizvodi nastali dejstvom lakaze. Utvrđeno je da lakaza dovodi do smanjenja koncentracije fenolnih jedinjenja u reakcionoj smeši, usled taloženja polifenola, kovalentnog vezivanja ili adsorpcije na protein.

Umreženi proteini dobijeni dejstvom lakaze su visoke molekulske težine, sa promenama u terciarnoj, ali ne i sekundarnoj strukturi. Tretman lakazom ne dovodi do značajnih promena u vezivanju IgE, što je potvrđeno ELISA-om i imunoblotom. Pojedini lakazom umreženi proteini kikirikija imaju promenjenu bioraspoloživost (Ara h 2, Ara h 6) u Caco-2 ćelijskom modelu transepitelijalnog transporta.

Ispitan je proteinski sastav ukupnog ekstrakta ambrozije, ekstrakta subpolenskih čestica i standardnog dijagnostičkog ekstrakta. Utvrđeno je da postoje značajne razlike u sadržaju alergena. Subpolenske čestice (u poredjenju sa ukupnim i standardnim ekstraktom) sadrže velike količine proteina Amb a 4, dok ukupni ekstrakt proteina polena sadrži proporcionalno visoku količinu profilina.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Veliki broj studija obradjuje problematiku analize fenolnih jedinjenja. S obzirom na porast alergijskih oboljenja u svetskoj populaciji, upoznavanje efekata fenolnih jedinjenja dobija na značaju. Brojni autori su pokazali da fenolna jedinjenja mogu imati vrlo raznovrsna imunomodulatorna dejstva, ali korelacija izmedju fenolnog sastava i različitih potencijalnih efekata u alergiji nije detaljno ispitivana. Poznato je da pojedini flavonoidi ostvaruju antialergijske efekte, dok efekti smeša nisu analizirani.

Subpolenske čestice su u poslednjih 10 godina predmet intenzivnih istraživanja, usled činjenice da mogu doprineti razvoju ozbiljnih oblika alergijske astme. Dosadašnji rezultati drugih autora su fokusirani na enzimske redoks osobine ekstrakta subpolenskih čestica, kao i na analizu signalnih lipidnih molekula. Fenolni sastav subpolenskih čestica do sada nije određivan ni za jednu biljnu vrstu.

Veliki broj studija je do sada izučavao vezivanje IgE antitela za modifikovane alergene. Rezultati koji se odnose na enzimski tretman alergena su vrlo često kontrindikatori, i mehanizmi kojim se ove reakcije odigravaju i interakcije do kojih dolazi nisu dovoljno poznate pri tretmanu realnog kompleksnog uzorka. Efekti lakaze na proteine kikirikija nisu izučavani.

Sa razvojem masenih spektrometara visoke rezolucije, istraživači su pristupili analizi proteoma iz različitih izvora. Proteomi polena različitih biljnih vrsta su ispitivani, ali su ovi podaci izostali za polen *A. artemisiifolia*. Pregled literature ukazuje da nisu vršena ni istraživanja proteomike subpolenskih čestica, kao ni komparativna proteomička istraživanja različitih proteinskih ekstrakta iz polena. Ovakav pristup, koji uključuje 2D elektroforezu, masenu spektrometriju i bioinformatiku, doprinosi novim saznanjima koji mogu da pomognu u razumevanju relevantnih mehanizma, ali i razvoju boljih dijagnostičkih procedura.

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo teze

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

Mihajlovic L, Radosavljevic J, Burazer L, Smiljanic K, Cirkovic Velickovic T: **Composition of polyphenol and polyamide compounds in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen and sub-pollen particles.** Phytochemistry 2015, **109**(5):125-32 (IF 2013 2.457 Plant Sciences (53/200))

Mihajlovic L, Radosavljevic J, Nordlund, M Krstic, Bohn T, Smit J, Buchert J, Cirkovic Velickovic T: **Peanut protein structure, polyphenol content of the extract and immune response to peanut proteins *in vivo* are modulated by laccase.** Food and Function 2015, poslat uredniku nakon manje revizije. (IF2013 2,713 Food Science and Technology 17/122, Biochemistry and Molecular Biology 141/289).

Tantoush Z, Stanic D, Stojadinovic M, Ognjenovic J, Mihajlovic L, Atanaskovic-Markovic M, Cirkovic Velickovic T: **Digestibility and allergenicity of β -lactoglobulin following laccase-mediated cross-linking in the presence of sour cherry phenolics.** *Food Chemistry* 2011, **125**(1):84-91. (IF2011 3,655 Food Science and Technology 6/128, Chemsitry, applied 3/71).

Tantoush Z, Apostolovic D, Kravic B, Prodic I, Mihajlovic L, Stanic-Vucinic D, Cirkovic Velickovic T: **Green tea catechins of food supplements facilitate pepsin digestion of major food allergens, but hampers their digestion if oxidized by phenol oxidase.** *Journal of Functional Foods* 2012, **4**(3):650-660. (IF2012 2,632 Food Science and Technology 20/122).

Radosavljevic J, Nordlund E, Mihajlovic L, Krstic M, Bohn T, Buchert J, Cirkovic Velickovic T, Smit J: **Sensitizing potential of enzymatically cross-linked peanut proteins in a mouse model of peanut allergy.** *Molecular Nutrition and Food Research* 2014, **58**(3):635-646. (IF2013 4,603, Food Science and Technology 4/122).

Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

Tantoush, Z., Mihajlović, L., Kravić, B., Ognjenović, J., Jankov, R.M., Veličković, T.C., Stanić-Vučinić, D. **Digestibility of β -lactoglobulin following cross-linking by *Trametes versicolor* laccase and apple polyphenols** *Journal of the Serbian Chemical Society*, **76**(6), 2011, 847-855 (IF 0.879)

Rad u pripremi

L. Mihajlovic, K. Smiljanic, D. Apostolovic, J. Ognjenovic, L. Burazer, T. Cirkovic Velickovic. Shotgun proteomics of *Ambrosia artemisiifolia* pollen and subpollen particles.

Poglavnje u knjizi renomiranog međunarodnog izdavača M13

Tanja Cirkovic Velickovic, Jana Ognjenovic and Luka Mihajlovic. **Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins by Ion-Exchange Chromatography.** In *Ion-exchange Technology II-Applications* (2012), Inamuddin; Luqman, Mohammad (Eds.), ISBN 978-94-007-4025-9

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

Ziyad Tantoush, Dragana Stanic, Marija Stojadinovic, Luka Mihajlovic, Marina Atanaskovic-Markovic and Tanja Cirkovic Velickovic. β -lactoglobulin allergenicity and radical scavenging activity following cross linking by laccase and sour cherry phenolics. *Proceedings of 6th International Congress on Pigments in Food*, June 20-24, 2010, Budapest, Hungary, pp 352-354

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

Ognjenovic, J.; Mihajlovic, L.; Stanic-Vucinic, D.; et al. **Green tea catechins suppress antigen-specific proliferation and cytokine secretion but elevate intracellular oxidative stress in**

peripheral blood mononuclear cells of pollen allergic individuals , 31st Congress of the European-Academy-of-Allergy-and-Clinical-Immunology (EAACI), Geneva, Switzerland, Jun 16-20, 2012, ALLERGY Volume: 67 Special Issue: SI Supplement: 96 Pages: 638-639

Krstic M., Kravic B., Mihajlovic L., Stanic-Vucinic D., Cirkovic Velickovic T. **Cytotoxic activity of coffee, green tea and cocoa ethanol extracts on HeLa cell line.** 1th International Congress on Cocoa Coffee, and Tea, September 13-16, 2011, Novara, Italy, Book of abstracts pp 151

Ziyad Tantoush, Danijela Apostolovic, Ivana Prodic, Bojana Kravic, Luka Mihajlovic, Dragana Stanic-Vucinic, Tanja Cirkovic Velickovic. **Green tea catechins of food supplements facilitate pepsin digestion of major food allergens, but hampers their digestion if oxidized by phenol oxidase.** Proceedings of the 1st International Conference on Food Digestion, Cesena, Italy, March 19-21,2011, pp 69

J. Radosavljević, L. Mihajlović, K. Willemsen, E. Selinheimo, J. Buchert, R. Pieters, J. Smith and T. Ćirković Veličković. **Allergenic potential of cross-linked peanut proteins.** COST 928 Final workshop, Naples, Italy , 2 - 4 March 2010, Book of Abstracts P14

Z.O. Tantoush, B. Kravić, M. Stojadinović, L. Mihajlović, D. Stanić and Tanja Ćirković Veličković. **Cross-linking of β -lactoglobulin by laccase mediated by different phenolic extracts.** COST 928 Final workshop, Naples, Italy , 2 - 4 March 2010, Book of Abstracts P12

Mihajlovic, L.; Cirkovic-Velickovic, T.; Jadranin, M.; Burazer, L.; Milcic-Matic, M. **The role of phenolic components of short ragweed pollen in IgE binding and immune response to allergens.** 29th Congress of the European-Academy-of-Allergy-and-Clinical-Immunology, London, UK, Jun 05-9, 2010, ALLERGY Volume: 65 Pages: 255

E. Zaključak komisije

Komisija je pregledala doktorsku disertaciju kandidata Luke Mihajlović, diplomiranog biohemičara pod naslovom: „**Efekti polifenolnih molekula i fenol oksidaza na strukturu i imunološka svojstva alergena**“ i zaključila da je disertacija proizvod samostalnog rada kandidata i da dobijeni rezultati predstavljaju kvalitetan doprinos u oblasti biohemije. Iz dobijenih rezultata su publikovana dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima. Rezultati teze su delom publikovani u još pet publikacija (tri publikacije kategorije M21, jednoj kategorije M23 i jednom poglavlju u knjizi renomiranog međjunardnog izdavača (M13)). Takođe, iz dobijenih rezultata je proisteklo šest saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i još jedan rad je u pripremi.

Razvijene su nove procedure za ekstrakciju fenolnih jedinjenja. Ispitan je efekat lakaze na fenole iz prehrambenih izvora. Prvi put je analiziran fenolni sastav polena ambrozije, kao i fenolni sastav subpolenskih čestica bilo koje biljne vrste.

Uporedjen je proteinski sastav ukupnog fenolnog ekstrakta polena ambrozije, ekstrakta subpolenskih čestica polena, kao i standardnog ekstrakta, korišćenjem proteomičkog pristupa. Po prvi put su predstavljeni rezultati totalne analize proteinskog i alergenog sastava subpolenskih čestica. Razvijene su i primenjene napredne metode „shotgun“ proteomike.

Rezultati ove teze doprinose fundamentalnim naučnim znanjima, ali imaju i direktnu primenu u razvoju i unapredjenju preparata za dijagnostiku i tretman alergija, kao i u prehrambenoj industriji.

Na osnovu svega navedenog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta u Beogradu da prihvati podnetu doktorsku disertaciju diplomiranog biohemičara Luke Mihajlovića i odobri njegovu javnu odbranu.

Beograd, 9.8.2015.

KOMISIJA

1. **dr Tanja Ćirković Veličković**, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (mentor)

2. **dr Marija Gavrović-Jankulović**, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

3. **dr Vlatka Vajs**, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

4. **dr Marijana Stojanović**, viši naučni saradnik Instituta za imunologiju i virologiju „Torlak“
