

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА**

Одлуком Наставно-научног већа Хемијског факултета одржаног 10. 10. 2019. год. избрани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Маје В. Крстић Ристивојевић, мастер биохемичара, под насловом:

„Monitoring of *in vitro* bioavailability and uptake of glycosylated food allergens using cell-based models“

Наслов дисертације на српском:

„Праћење *in vitro* биоусвојивости и преузимања гликозилованих алергена хране употребом ћелијских модела“

Након прегледа докторске дисертације кандидата, предајемо Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета следеће:

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Маје В. Крстић Ристивојевић написана је на 94 страна А4 формата (фонт 12, размак између редова 1,5) и садржи 38 слика (35 слика у главном тексту, а 3 слике у прилогу), 1 табелу и 159 референци. Докторска дисертација написана је на енглеском језику и садржи 9 поглавља: 1. *Увод*, 2. *Теоријски део*, 3. *Циљеви*, 4. *Пепсинска дигестија гликозилованог говеђег серум албумина*, 5. *Утицај α -Гал гликозилације на површини протеина на њихов транспорт кроз монослој Сасо-2 ћелија, процена биорасположивости*, 6. *Утицај α -Гал гликозилације на површини протеина на њихово преузимање и разградњу у незрелим дендритичким ћелијама које потичу од моноцита*, 7. *Закључци*, 8. *Додатак* и 9. *Литература*. Поред тога, докторска дисертација садржи Захвалницу, Списак скраћеница, Сажетак на енглеском и српском језику, Садржај, Биографију аутора на енглеском и српском језику. Поред наведеног, дисертација садржи и изјаву о ауторству, изјаву о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и изјаву о коришћењу.

У **Увод**-у истакнута је потреба као и изазови у истраживању сложеног проблема као што су алергије на храну. Поред тога, кандидат подсећа да поштовање етичких

норми у науци захтева употребу и развој релевантних *in vitro* модела. Такође, кандидат даје дефиницију биорасположивости која је као појам уведена и неизбежна у описивању процеса током развијања алергије на храну.

У **Теоријском делу** кандидат уводи основне појмове неопходне за разумевање и значај спроведеног истраживања. У овом поглављу објашњене су реакције имуног система одговорне за развој алергијских болести са акцентом на алергију на храну. Кандидат описује анатомију гастроинтестиналног система и кључне актере и механизме важне за варење, ослобађање и транспорт алергена хране. Поред тога, кандидат разматра проблематику нове врсте алергије на храну, алергије на црвено месо, у смислу представљања тренутних сазнања везаних за овај феномен. Такође, кандидат уводи и објашњава појам алфа-Гал епитопа (галактозил- α -1,3-галактоза) једног од уобичајених посттранслационих модификација протеина бактерија нормалне цревне флоре као и животињских протеина. Такође, кандидат разматра развој и употребу *in vitro* система за проучавање физиолошких процеса као што су биорасположивост и преузимање алергена од стране имуних ћелија.

У поглављу **Циљеви** кандидат је дефинисао главне циљеве и смернице за израду ове докторске дисертације.

Поглавље **Пепсинска дигестија гликозилованог говеђег серум албумина** састоји се од четири одељка: уводни део који се односи на тренутну проблематику, методологија, резултати и дискусија. У оквиру овог поглавља представљени су резултати пепсинске дигестије модел протеина говеђи серум албумин-BSA (од енгл. **bovine serum albumin**) и BSA коњугован α -Гал-ом. Дигестија је рађена коришћењем Infogest's статичког модела дигестије, који је један од предложених консензус *in vitro* модела. Добијене дигестионе смеше протеина и пептида раздвајане су електрофоретском техником и анализиране коришћењем различитих система за детекцију као што су бојење бојом CBV R250, флуоресцентна детекција и имуноблот. Такође, присуство α -Гал епитопа на резултујућим фрагментима након дигестије детектовано је имуноблотом.

Поглавље **Утицај α -Гал гликозилације на површини протеина на њихов транспорт кроз монослој Са_с-2 ћелија, процена биорасположивости** састоји се од четири одељка: уводни део који се односи на тренутну проблематику, методологија, резултати и дискусија. Ово поглавље се бави проценом биорасположивости. У ту сврху

коришћен је ћелијски систем који верно опонаша епител танког црева, Сасо-2 ћелијски монослој. Процентом вијабилности ћелија и мерењем електричног отпора епитела праћен је квалитет коришћеног *in vitro* система. Трансцитоза α -Гал гликозилованих протеина и утицај глико-компоненте протеина на његов транспорт испитивани су у различитим временским тачкама детекцијом флуоресценце која потиче од протеина претходно обележених AlexaFluor 488 бојом. Даље, детекција протеина и његове глико-компоненте (α -Гал) у лизатима Сасо-2 ћелија након трансцитозе установљена је коришћењем имуноблота. Конфокална ласерска микроскопија-CLSM (од енгл. **confocal laser scanning microscopy**) је коришћена за додатну детекцију протеина унутар Сасо-2 ћелија, као и да би се стекао утисак о њиховој просторној расподели. Након диференцијалног центрифугирања лизата Сасо-2 ћелија, интактни протеини, као и α -Гал епитоп, детектовани су у ендозомалној фракцији имуноблот техником. Такође, ниво галектина-3, лектина који може бити повезан са проупалним својствима, а присутан је у интестиналним ћелијама, праћен је имуноблот анализом.

Поглавље **Утицај α -Гал гликозилације на површини протеина на њихово преузимање и разградњу у незрелим дендритичким ћелијама које потичу од моноцита**, бави се утицајем гликозилације протеина на њихово преузимање и разградњу у дендритичним ћелијама. У ту сврху, незреле дендритичне ћелије које потичу од моноцита-iMDDCs (од енгл. **immature monocyte-derived dendritic cells**) су изоловане из крви здравих особа и пацијената са алергијом на црвено месо, а преузимање протеина обележених AlexaFluor 488 бојом од стране ових ћелија праћено је техником проточне цитометрије. Испитивање путева интернализације протеина од стране iMDDCs испитивано је коришћењем различитих блокатора интернализације и анализирано проточном цитометријом. Даље, да би се стекао утисак о просторној расподели протеина унутар iMDDCs коришћена је CLSM техника. Такође, имуноблот анализа открила је присуство интактних протеина у ћелијским лизатима чак и након продужене инкубације ћелија са гликозилованим протеинима.

У **Закључцима** су истакнути најважнији резултати.

Цитирана **Литература** (159 референци) обухвата теме ове докторске дисертације у пољу истраживања и покрива све делове дисертације.

У **Додатку** су дате неке опште смернице и описани протоколи неопходни за рутински рад са културама ћелија.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У оквиру ове докторске дисертације испитивана је биорасположивост и преузимање гликозилованих алергена хране, коришћењем статичког *in vitro* модела гастричне дигестије као и коришћењем *in vitro* ћелијских модела. За праћење биорасположивости коришћен је Сасо-2 ћелијски монослој који имитира цревни епител, а преузимање алергена праћено је у iMDDCs. Добијени резултати су показали да стабилност протеина и образац насталих пептида током гастричне дигестије зависи од гликозилација протеина и доводи до продуженог задржавања интактних протеина као и великих протеинских фрагмената богатих α -Гал епитопом. Такође, трансцитоза α -Гал гликозилованих протеина кроз Сасо-2 монослој је смањена у поређењу са протеинима без α -Гал епитопа као и у поређењу са протеинима који носе другачији тип гликозилације. Интактни α -Гал гликозиловани протеини детектовани су у лизатима Сасо-2 ћелија, у ендозомској фракцији. Осим тога, нема промене нивоа про-инфламаторног фактора (галектин-3) у Сасо-2 ћелијама инкубираним са α -Гал гликозилованим протеинима у поређењу са протеинима без гликозилације. С друге стране, праћење преузимања α -Гал гликозилованих протеина показало је да α -Гал на површини протеина појачава њихову интернализацију у iMDDCs. Резултати показују да рецептором посредована ендцитоза и макропиноцитоза учествују у преузимању протеина који садрже α -Гал од стране iMDDCs. Штавише, α -Гал гликозилација штити протеин од деградације у iMDDCs и као таква може продужавати њихово време обраде и изложеност на површини ћелије. BSA- α -Гал се узима и обрађује највероватније у ендозомима iMDDCs.

Ц. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Ова докторска дисертација даје увид у утицај α -Гал епитопа на површини протеина на њихову дигестију у желуцу, транспорт кроз епител црева и накнадно на њихово преузимање и разградњу у имуним ћелијама. Све већи број студија показује да су угљени хидрати снажни покретачи алергијског одговора. Тако да у погледу испитивања механизма који леже у основи алергије на црвено месо, нове врсте алергије на храну, допринос ове дисертације није занемарљив. Већ поменута чињеница да је алергија на црвено месо нова врста алергије на храну указује на потребу али и недостатак студија које се баве овом проблематиком, посебно механизмима који леже у основи одложених симптома на ову врсту алергије. Још увек студије се баве

откривањем особа алергичних на црвено месо као и на карактеризацију њиховог имунолошког одговора, јер примећено одлагање симптома алергије често доводи до непрепознавања да се ради о овој врсти алергије.

Резултати добијени у овој дисертацији применом консензусних модела дигестије и *in vitro* ћелијских модела драгоцени су будући развојових модела.

Д. Радови и саопштења који су део докторске дисертације

Резултати испитивања у оквиру ове докторске дисертације објављени су до сада у два научна рада и приказани на две међународне конференције. Оба рада су објављена у врхунским међународним часописима, који према званичној класификацији која се користи у Републици Србији спадају у М21 категорију.

М21 - Радови објављени у врхунским међународним часописима

1. **M. Krstić Ristivojević, J. Grundström, D. Apostolovic, M. Radomirovic, V. Jovanovic, V. Radoi, G. MB Kiewiet, V. Vukojević, T. Ćirković Veličković & M. van Hage.** Alpha-Gal on the Protein Surface Hampers Transcytosis through the Caco-2 Monolayer. *International Journal of Molecular Sciences*, (2020), vol. 21(16), DOI: 10.3390/ijms21165742. (Biochemistry & Molecular Biology; IF 2019: 4.556 (74/297)).
2. **M. Krstić Ristivojević, J. Grundström, T. A. T. Tran, D. Apostolovic, V. Radoi, M. Starkhammar, V. Vukojević, T. Ćirković Veličković, C. Hamsten & M. van Hage.** α -Gal on the protein surface affects uptake and degradation in immature monocyte derived dendritic cells. *Scientific Reports*, (2018), vol. 8(1), Article number: 12684, DOI: 10.1038/s41598-018-30887-8. (Multidisciplinary Sciences; IF 2017: 4.122 (12/64)).

М34 - Саопштења са међународних скупова штампана у изводу

1. **Krstić Maja, Danijela Apostolovic, Tran Thu Thi Anh, Grundstrom Jeanette, Radoi Vlad, Vukojević Vladana, Ćirković Veličković Tanja, Hamsten Carl, van Hage Marianne.** Alpha-gal epitope on protein surface affects uptake and degradation in immature monocyte-derived dendritic cells. EAACI Congress, 17 – 21 June 2017, Helsinki, Finland, P1611.
2. **Krstic Maja, Apostolovic Danijela, Grundstrom Jeanette, Tran Thu Thi Anh, Ćirkovic Velickovic Tanja, Hamsten Carl, van Hage Marianne.** α -Gal epitope on protein surface decreases transcytosis through Caco-2 monolayer. EAACI Congress 2016, 11 – 15 June 2016, Vienna, Austria, P1504.

Е. Провера оригиналности докторске дисертације

Кандидат Маја В. Крстић Ристивојевић завршава и браниће докторску дисертацију из Биохемије на основу Правилника о докторским академским студијама Универзитета у Београду - Хемијског факултета бр 1557/1 од 12. децембра 2013 године, који не захтева проверу плагијата. Међутим, због добре истраживачке праксе и моралног кодекса, уважен је и Правилник о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду бр. 204/22.06.2018.). Из извештаја генерисаног програмом „iThenticate” којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Праћење *in vitro* биоусвојивости и преузимања гликозилованих алергена хране употребом ћелијских модела“, ауторке Маја В. Крстић Ристивојевић, констатујемо да утврђено подударање текста износи 25%. Овај степен подударности последица је чињенице да је теза написана на енглеском језику и да су из ње произашла два објављена рада као и, општих места, личних имена/звања, назива институција/департамана, назива појмова на енглеском језику, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. Став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ф. Закључак (објашњење научног доприноса докторске дисертације)

На основу свега изложеног, може се закључити да је у поднетој дисертацији под називом „Праћење *in vitro* биоусвојивости и преузимања гликозилованих алергена хране употребом ћелијских модела“ кандидат Маја В. Крстић Ристивојевић успешно одговорила на све претходно постављене задатке. Комисија сматра да резултати објављени у овој докторској дисертацији представљају оригиналан научни допринос који се односи на испитивање утицаја α -Гал гликозилације протеина на њихову биорасположивост, преузимање и обраду од стране имуних ћелија.

Резултати ове докторске дисертације објављени су у два научна рада у врхунским међународним часописима (категорије М21) и кандидат је први аутор оба рада као и два саопштења на међународним конференцијама(М34).

На основу свега изложеног, а у складу са Законом о Универзитету и Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени услови за одбрану докторске дисертације и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета, да поднету докторску дисертацију Маје В. Крстић Ристивојевић, под називом „Праћење *in vitro* биоусвојивости и преузимања гликозилованих алергена хране употребом ћелијских модела“ прихвати и одобри њену јавну одбрану за стицање академског звања Доктора бихемијских наука.

Београд,

30.10.2020. год.

Чланови комисије:

Проф. др Тања Ђирковић Величковић,
редовни професор, Универзитет у
Београду – Хемијски факултет

Проф. др Marijanne van Nage,
редовни професор, Каролинска
Институт, Катедра за медицину Солна,
Одељење за имунологију и алергију

Доц. др Марија Стојадиновић,
доцент, Универзитет у Београду –
Хемијски факултет

Др Весна Јовановић,
виши научни сарадник, Универзитет у
Београду – Хемијски факултет

Др Лидија Буразер,
виши научни сарадник, Институт за
вирусологију, вакцине и серуме
„Торлак“