

## **Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета**

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 14.12.2017. године, одлуком број 1372/2, одређени смо за Комисију за подношење извештаја о оцени испуњености услова и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације Марије Б. Перушко, мастер биохемичара, пријављене под називом:

**“Структура и функција алергена млека модификованих у Мајлардовој реакцији”**

На основу поднете и прикупљене документације, подносимо Наставно-научном већу следећи:

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **А. Биографски подаци о кандидату**

Марија Перушко је рођена 17.06.1988. године у Београду, Република Србија, где је завршила основну школу и гимназију. Универзитет у Београду – Хемијски факултет, смер Дипломирани биохемичар је уписала 2007, а завршила 2012. године са просечном оценом 9,03, и оценом 10 на завршном раду под насловом „Редукција алергености главног алергена гриња, Dег р 2, фрагментацијом“. Мастер студије је уписала исте године на Универзитету у Београду - Хемијски факултет, на смеру Биохемија и завршила 2013. године са просечном оценом 9,20, и оценом 10 на завршном раду под насловом „Услови макромолекулског нагомилавања (macromolecular crowding) појачавају гликовање протеина сурутке у ултразвуком индукованој Мајлардовој реакцији“. Докторске студије на Универзитету у Београду - Хемијском факултету, смер Биохемија је уписала 2013. године. Од 01.02.2014. године ангажована је на националном пројекту: „Молекуларне особине и модификације неких респираторних и нутритивних алергена“ (2011 – до сада), ОИ 172024, у звању истраживач приправник, са запослењем у Иновационом центру Хемијског факултета. 01.03.2015. године изабрана је у звање истраживач сарадник. Учесница је COST акције: Improving Allergy Risk Assessment Strategy for New Food Proteins (ImpARAS) (FA1402), преко које је боравила три месеца на Универзитету у Утрехту, Утрехт, Холандија и два месеца на Каролинска Институту, Стокхолм, Шведска. Члан је Српског хемијског друштва и Биохемијског друштва Србије.

У зимском семестру академске 2013/2014, 2014/2015. и 2016/2017. године била је ангажована као сарадник у настави на обавезном предмету Ензимологија, на смеру Биохемија, Универзитета у Београду – Хемијског факултета. У летњем семестру, од академске 2015/2016 до данас, ангажована је као сарадник у настави на изборном предмету Увод у биохемију, смер Биохемија, Универзитета у Београду – Хемијског факултета. До сада је објавила два научна рада у међународним часописима изузетних вредности и један рад у врхунском међународном часопису и има седам саопштења на међународним и националним скуповима.

## **Б. Библиографски подаци о кандидату**

### **Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a=10)**

M. Perusko, A. Al Hanish, J. Mihailovic, S. Minic, S. Trifunović, I. Prodic, T. Cirkovic Velickovic, Antioxidative capacity and binding affinity of the complex of green tea catechin and beta-lactoglobulin glycated by the Maillard reaction, *Food Chemistry*, 232, pp. 744 - 752, 2017.

M. Perusko, A. Al-Hanish, T. Cirkovic Velickovic, D. Stanic-Vucinic, Macromolecular crowding conditions enhance glycation and oxidation of whey proteins in ultrasound-induced Maillard reaction, *Food Chemistry*, 177, pp. 248 - 257, 2015.

### **Радови објављени у врхунским часописима међународног значаја (M21=8)**

K. Smiljanic, D. Apostolovic, S. Trifunović, J. Ognjenovic, M. Perusko, L. Mihajlovic, L. Burazer, M. van Hage, T. Cirkovic Velickovic. Sub-pollen particles are rich carriers of major short ragweed allergens and NADH dehydrogenases: quantitative proteomic and allergomic study, *Clinical and Experimental Allergy*, 47, 6, pp. 815 - 828, 2017.

*Рад у процесу рецензије у часопису Clinical and Experimental Allergy*

M. Perusko, M. van Roest, D. Stanic-Vucinic, P. Simons, R. Peters, T. Cirkovic Velickovic, J. Smit. Glycation of  $\beta$ -lactoglobulin changes allergenicity by alterations in cellular uptake and degradation.

### **Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу (M34=0,5)**

K. Smiljanic, A. Mohamed, S. Trifunovic, M. Perusko, L. Mihajlovic, J. Ogenovic, T. Cirkovic Velickovic, Comparison of 2D proteomic maps revealed properties of *Ambrosia artemisiifolia* sub-pollen particles accounting for more severe asthma symptoms than its whole pollen grains, 4th international congress on analytical proteomics, *Journal of integrated omics (JIOMICS)*, 5, 2, pp. 34 - 35, Costa di Caparica, Lisbon, Portugal, 6. - 9. Sep, 2015.

E. Stein, J. Mihailovic, A. Inic-Kanada, K. Smiljanic, M. Perusko, S. Trifunović, N. Schuerer, D. Stanic-Vucinic, E. Ghasemian, T. Barisani-Asenbauer, T. Cirkovic Velickovic, Quantitative proteome study of *Chlamydia trachomatis* ocular serovar B proteins associated with trachomatous trichiasis, Investigative Ophthalmology and Visual Science, ARVO Annual Meeting 2017, ARVO journals, 58, 8, pp. 3575 - 3575, Baltimore, MD, USA, 1. - 7. Jun, 2017.

A. Inic-Kanada, K. Smiljanic, E. Stein, J. Mihailovic, P. Ristivojevic, H. Chalabi, M. Krstic, N. Schuerer, M. Perusko, S. Trifunovic, D. Stanic-Vucinic, T. Cirkovic Velickovic, T. Barisani-Asenbauer, Identification and quantification of trachoma associated *Chlamydia trachomatis* antigens, Abstract Book of the 8th Meeting of The European Society for Chlamydia Research, European Society for Chlamydial Research, pp. A24 - A24, Town Hall, oxford, United Kingdom, 6. - 9. Sep, 2016.

J. Mihailovic, K. Smiljanic, A. Inic-Kanada, E. Stein, M. Perusko, S. Trifunovic, N. Schuerer, D. Stanic Vucinic, E. Ghasemian, T. Barisani-Asenbauer, T. Cirkovic Velickovic, Trachoma associated (*Chlamydia trachomatis*) antigens quantitative study, Abstract Book of X Annual Congress of the European Proteomics Association 2016, European Proteomic Association, pp. P36 - P36, Istanbul, Turkey, 22. - 25. Jun, 2016.

#### **Радови саопштени на скуповима националног значаја штампани у изводу (M64=0,2)**

M. Perusko, T. Cirkovic Velickovic, D. Stanic-Vucinic, Caramelization of fructose induced by high intensity ultrasound and antioxidative activity of caramel products, Book of Abstracts of the 52nd Meeting of the Serbian Chemical Society, Srpsko hemijsko drustvo, pp. 88 - 88, Novi Sad, Srbija, 29. - 30. May, 2015.

M. Perusko, M. van Roest, D. Stanic-Vucinic, R. Pieters, T. Cirkovic Velickovic, J. Smit, Effects of Maillard reaction on immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin, Book of Abstracts of the 53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, Srpsko hemijsko drustvo, pp. 74 - 74, Kragujevac, Srbija, 10. - 11. Jun, 2016.

K. Smiljanic, D. Apostolovic, M. Perusko, S. Trifunovic, L. Mihajlovic, L. Burazer, T. Cirkovic Velickovic, Proteomic comparison reveals sub-pollen particles as potentially the most dangerous allergenic carriers among different pollen fractions of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.), Book of Abstracts of the 53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, Srpsko Hemijsko Drustvo, pp. 68 - 68, Kragujevac, Srbija, 10. - 11. Jun, 2016.

## **V. Образложење теме**

### **1. Научна област**

Научна област докторске дисертације је биохемија, за коју је матичан Универзитет у Београду - Хемијски факултет.

## **2. Предмет рада**

Предмет рада ове дисертације је испитивање ефеката Мајарове реакције на структуру и функцију протеина млека. Мајарова реакција је реакција неензимског гликовања протеина која се спонтано одвија приликом обраде хране и за последицу има формирање протеина измењених физичко-хемијских особина.

Као полазни материјал ће се користити сирово, нетретирано млеко из којег ће се припремати сурутка или изоловати појединачни алергени млека, који ће бити ковалентно модификовани простим сахаридима у Мајаровој реакцији. Очекује се да кандидат оптимизује процедуру према којој ће протеини сурутке бити брзо и ефикасно гликовани, а уз употребу ултразвучног третмана. Протеини сурутке се често користе као додаци храни због њиховог нутритивног значаја и технолошко-функционалних особина. Стога је идеја да се протеини сурутке модификују у Мајаровој реакцији у циљу побољшања њихових технолошко-функционалних особина и да се испитају неке физичко-хемијске особине насталих производа које су од значаја за технолошку примену у прехранбеној индустрији. Биће испитана гликација протеина, структурне промене протеина, склоност формирању агрегата, оксидативне промене протеина, антиоксидативна активност, температурна и рН стабилност.

Како Мајарова реакција доводи до ковалентног везивања сахараида за протеине и њихових структурних промена, очекује се да и линеарни и конформациони епитопи алергена млека могу бити измењени, чиме би била измењена и алергеност модификованих протеина. Ефекти Мајарове реакције на алергеност биће испитивани на пречишћеном алергену млека. Биће упоређена алергеност високо гликованог и нативног алергена млека. Такође, ћелије имунског система могу различито препознавати и обрађивати гликовани и нативни алерген. Стога ће ова два облика алергена бити тестирана у различитим ћелијским процесима који су значајни за успостављање имунског одговора на протеин. Испитивање ће обухватити анализе степена и механизма преузимања алергена од стране дендритских ћелија, испитивање деградације алергена унутар дендритских ћелија и испитивање транспорта алергена кроз модел систем интестиналног епитела.

## **3. Циљеви истраживања**

Циљеви истраживања у оквиру предложене докторске дисертације су следећи:

- а) оптимизација поступка за ефикасно гликовање протеина сурутке применом ултразвучног третмана;
- б) одређивање степена реализације Мајарове реакције;
- в) испитивање физичко-хемијских особина насталих производа Мајарове реакције;
- г) добијање и испитивање алергености производа Мајарове реакције алергена млека;

д) испитивање преузимања и обраде производа Мајарове реакције од стране дендритских ћелија;

ђ) испитивање интестиналног транспорта производа Мајарове реакције у *in vitro* модел систему;

е) испитивање способности алергена модификовани Мајаровом реакцијом да изазову дегранулацију базофила уз употребу олигоклонских хуманизованих IgE антитела.

#### 4. Методе истраживања

У циљу испитивања ефеката Мајарове реакције на алергеност и функционалне особине алергена млека, предвиђено је коришћење култура ћелија изолованих из одраслих мишева соја СЗН/НеОуЈ, који ће бити узгајани у виваријуму Института за науке о процени ризика, Универзитета у Утрехту, Утрехт, Холандија. Истраживања у културама ћелија изолованих из мишева биће у целости обављена у Институту за науке о процени ризика, Универзитета у Утрехту, Утрехт, Холандија, а у складу са прописаним етичким нормама и директивама. У прилогу овог извештаја је достављена етичка дозвола, издата од стране Етичке комисије Универзитета у Утрехту, лиценца 2013.П.01.004.

У току израде ове докторске дисертације предвиђено је коришћење следећих биохемијских експерименталних техника: а) **хроматографске технике** – за изоловање и пречишћавање алергена млека; б) **електрофоретске технике** (SDS PAGE, нативна PAGE, изоелектрофокусирање) – за карактеризацију протеинских производа Мајарове реакције и проверу чистоће изолованих алергена; в) **спектрометрија циркуларног дихроизма** – за анализу структурних промена гликованих протеина сурутке или гликованих пречишћених алергена; г) **спектрофотометрија, спектрофлуориметрија** – за процену степена Мајарове реакције на протеинима сурутке или пречишћеним алергенима, испитивање антиоксидативне активности, праћење оксидативних промена на гликованим протеинима, одређивање температурне и рН стабилности гликованих протеина; д) **проточна цитометрија** – за праћење преузимања и деградације алергена унутар дендритских ћелија; ђ) **имунохемијске методе** – тест ELISA-е за квантификацију алергена млека и квантификацију цитокина; е) **рад са културама ћелија** – рад са примарном културом ћелија (дендритске ћелије), и са имортализованим ћелијским линијама (Сасо-2, RBL-2H3).

#### 5. Актуелност проблематике у свету

Мајарова реакција је спонтана реакција између аминок и карбонилне групе, и у хемији хране се обично одвија између протеина и сахараида. Термална обрада хране поспешује ову реакцију и у савременом свету су сиреви, месо и брза храна посебно богати извори Мајарових производа.

Мајаровом реакцијом је могуће побољшати технолошко-функционалне особине протеина као што су: растворљивост, способност формирања пене, термална стабилност, способност стабиловања емулзије и антиоксидативна активност (1, 2). Метода која се уобичајено користи за убрзавање Мајарове реакције је суво загревање које има неколико недостатака: траје неколико дана или недеља, степен реакције се не може контролисати, реакција је ограничена неједнаким контактом међу реактантима па је гликовање непотпуно. Загревање у раствору скраћује реакционо време и омогућава бољу контролу степена реакције. Међутим, високе температуре доводе до агрегације протеина и смањују степен гликовања. Третман ултразвуком високог интензитета и ниске фреквенције (20-100 kHz) представља нову технологију са великом могућношћу да нађе примену у технологији хране (3). Њена примена је тестирана у обради млечних производа и показано је да побољшава физичке и функционалне особине сурутке (4), а неколико студија је показало и да третман ултразвуком може убрзати Мајарову реакцију (5, 6). Претходна истраживања су показала да гликокоњугати бета-лактоглобулина добијени у Мајаровој реакцији убрзаној третманом ултразвуком показују повећану антиоксидативну активност уз мале промене у секундарној и терцијарној структури протеина (6).

Познато је и да Мајарова реакција на алергенима хране има бројне ефекте на њихову имуногеност. Она утиче на препознавање алергена од стране IgE антитела, било тако што маскира специфичне епитопе смањујући везивање IgE-а за алерген (7), или тако што доводи до формирања неоепитопа и тиме доводи до препознавања алергена од стране IgE антитела (8). Дендритске ћелије које представљају везу између урођеног и стеченог имунитета и имају важну улогу у покретању и обликовању имунског одговора, имају неколико рецептора којима могу препознати Мајарове структуре на протеинима. Интеракције са овим рецепторима утичу на препознавање, преузимање и обраду алергена од стране дендритских ћелија, што може имати последице на сазревање дендритских ћелија и на активацију наивних Т ћелија. Показано је да Мајарове структуре на овалбумину, главном алергену јаја, интерагују са рецепторима чистачима класе А, доводе до повећаног преузимања овог алергена од стране дендритских ћелија и до јачег Th2 имунског одговора (9). До сада је веома мало познато о обради и деградовању алергена унутар дендритских ћелија иако ти процеси могу бити од великог значаја у обликовању имунског одговора.

Из свега наведеног се може закључити да постоји потреба за детаљним истраживањем ефеката Мајарове реакције на протеине хране, како у циљу њихове примене у прехранбеној индустрији, тако и у испитивању имуногених својстава производа Мајарове реакције.

## **Референце**

1. Oliver CM, Melton LD, Stanley RA. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006;**46**(4):337-350.

2. Amarowicz R. Antioxidant activity of Maillard reaction products. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2009;**111**(2):109-111.
3. Chandrapala J, Oliver C, Kentish S, Ashokkumar M. Ultrasonics in food processing. *Ultrason Sonochem* 2012;**19**(5):975-983.
4. Zisu B, Lee J, Chandrapala J, Bhaskaracharya R, Palmer M, Kentish S, et al. Effect of ultrasound on the physical and functional properties of reconstituted whey protein powders. *J Dairy Res* 2011;**78**(2):226-232.
5. Corzo-Martinez M, Montilla A, Megias-Perez R, Olano A, Moreno FJ, Villamiel M. Impact of high-intensity ultrasound on the formation of lactulose and Maillard reaction glycoconjugates. *Food Chem* 2014;**157**:186-192.
6. Stanic-Vucinic D, Prodic I, Apostolovic D, Nikolic M, Velickovic TC. Structure and antioxidant activity of beta-lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions. *Food Chem* 2013;**138**:590-599.
7. Taheri-Kafrani A, Gaudin JC, Rabesona H, Nioi C, Agarwal D, Drouet M, et al. Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *J Agric Food Chem* 2009;**57**(11):4974-4982.
8. Nakamura A, Watanabe K, Ojima T, Ahn D-H, Saeki H. Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *J Agric Food Chem* 2006;**54**(25):9529-9534.
9. Hilmenyuk T, Bellinghausen I, Heydenreich B, Ilchmann A, Toda M, Grabbe S, et al. Effects of glycation of the model food allergen ovalbumin on antigen uptake and presentation by human dendritic cells. *Immunology* 2010;**129**(3):437-445.

## **6. Очекивани резултати**

Очекује се да кандидат оптимизује процедуру према којој ће протеини сурутке бити ефикасно гликовани у Мајаровој реакцији, уз примену ултразвучног третмана и да окарактерише настале производе (процена степена Мајарове реакције, структурне промене протеина, склоност формирању агрегата, оксидативне промене протеина, антиоксидативна активност, температурна и рН стабилност).

У другом делу докторске дисертације, од кандидата се очекује да испита, користећи пречишћени протеински алерген млека, утицај Мајарове реакције на алергеност и имуногеност протеина (степен и механизам преузимања алергена од стране дендритских ћелија, испитивање деградације алергена унутар дендритских ћелија и испитивање транспорта алергена кроз модел систем интестиналног епитела).

## Г. Закључак комисије

На основу свега изложеног, Комисија сматра да је предложена тема докторске дисертације оправдана, научно заснована и да ће добијени резултати дати значајан допринос разумевању ефеката Мајарове реакције на структуру и функционалне особине протеина млека. Стога предлажемо Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да одобри Марији Б. Перушко, мастер биохемичару, израду докторске дисертације под измењеним насловом: „**Структура и функција протеина млека модификованих у Мајаровој реакцији**“. За ментора предлажемо др Тању Ћирковић Величковић, редовног професора Универзитета у Београду - Хемијског факултета и др Драгану Станић-Вучинић, научног саветника Универзитета у Београду - Хемијског факултета.

Београд, 22.01.2018.

### Чланови комисије:

др Тања Ћирковић Величковић  
редовни професор Универзитета у Београду -  
Хемијског факултета, ментор

др Зорана Ферјанчић  
ванредни професор Универзитета у Београду –  
Хемијског факултета

др Драгана Станић-Вучинић  
научни саветник Универзитета у Београду -  
Хемијског факултета, ментор

др Маријана Стојановић  
виши научни сарадник Института за  
вирусологију, вакцине и серуме “Торлак”