

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

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Андријане Н. Нешић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно – научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној дана 11.10.2018. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Андријане Н. Нешић, мастер биохемичара, истраживача сарадника Хемијског факултета, Универзитета у Београду, под називом:

„Ефекти протеазне активности актинидина на интегритет ћелија интестиналног епитела“

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 31.01.2019. године на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације под редним бројем 61206-5122/4-19.

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно – научног већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Андријане Н. Нешић написана је на 116 страна, А4 формата, фонт 12, проред 1,5 и садржи 45 слика и 11 табела. Докторска дисертација је подељена на 8 поглавља: Увод (2 стране), Теоријски део (37 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Резултати (26 страна), Дискусија (7 страна), Закључак (1 страна), Материјал и методе (24 страна), Литература (17 страна, 216 цитата). Поред наведеног дисертација садржи и Насловне стране на српском и енглеском језику, Страна са именима чланова комисије, Захвалницу (2 стране), Сажетак на српском и енглеском језику (по 2 стране), Листу скраћеница (3 стране), Садржај (3 стране), Биографију кандидата (2 стране), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истовестности (1 страна), и Изјаву о коришћењу (2 стране).

У Уводу су приказани предмет и циљеви истраживања докторске дисертације, уз осврт на актуелна истраживања која су од значаја за ову тезу. Укратко је дат приказ учесталости алергије на храну од кога пати све већи број особа у свету, и који утиче на квалитет живота. Описан је значај гастроинтестиналне баријере у одржању ткивне хомеостазе, као и улога епителних ћелија у њеном очувању. Представљени су догађаји који утичу на интегритет ове баријере приликом настанка алергије на храну. Посебан осврт је дат на алергију која се јавља на воће киви, и описан је значај актинидина, главног алергена овог воћа који доводи до сензитизације.

Теоријски део је подељен на пет целина. У целини *Гастроинтестинална баријера: улога у физиолошким и патолошким стањима* говори се о организацији епителне

баријере и лимфоидном ткиву повезаном са гастроинтестиналним трактом. Такође, описане су компоненте које одржавају интегритет епителне баријере, посебно међућелијске чврсте везе. У овој целини је приказан и механизам којим ћелије гастроинтестиналног тракта препознају, преузимају и процесују антигене. Друга целина ***Хомеостаза и дисфункција интестиналне баријере*** говори о механизмима који регулишу одржање интегритета баријере и имунолошком одговору на антигене из хране, тј. оралној толеранци. Наведени су догађаји који могу да изазову дисфункцију интестиналне баријере. Затим су, у следећој целини: ***Експерименталне технике за праћење функције интестиналне баријере*** приказане су методе и модел системи којим се, експериментално прате промене у интегритету епителне баријере. Следећа целина: ***Алергија на храну*** описује учесталост и клиничке симптоме овог поремећаја са освртом на молекулске процесе који му претходе. Следећа целина: ***Алергија на киви*** описује учесталост, клиничке симптоме и патогенезу алергије на ово воће. Такође, описани су сви до сада познати алергени кивија, са освртом на главни – актинидин, његова структурна и имунолошка својства.

Поглавље **Циљеви** садржи јасан опис основних задатака истраживања којима се ова дисертација бавила.

Поглавље **Резултати** истраживања су прегледно приказани у седам целина. Прва и друга целина приказују резултате који се односе на пречишћавање и биохемијску карактеризацију актинидина, ензима са протеазном активношћу и главног алергена плода зеленог кивија. Чистоћа пречишћеног препарата актинидина је показана СДС ПАГ електрофорезом у редукујућим условима. Такође, молекуласа маса и примарна структура актинидина је потврђена масеном спектрометријом. Протеолитичка активност актинидина је измерена у ензимском есеју уз коришћење казеина као супстрата. Трећа целина приказује оптимизацију услова активације актинидина дитиотреитолом и инкубацијом у медијумима за узгајање хуманих епителних ћелија. У четвртој целини је приказан утицај актинидина на пропустљивост епителне баријере на *in vivo* (C57BL/6 сој мишева) и *in vitro* модел систему (ћелијској линији хуманог аденокарцинома колона, Сасо-2). Ефекат актинидина на регулацију експресије информационалних РНК, које кодирају синтезу за протеине чврстих веза, описана је у петој целини. Ови резултати су добијени на *in vivo* (C57BL/6 сој мишева) и *in vitro* (дводимензионални (2Д) органоиди, добијени из мишије плурипотентне матичне ћелије и Сасо-2) моделу. У шестој целини су приказани резултати ефекта протеазне активности актинидина на производњу и експресију информационе РНК за проинфламаторне, и проалергене цитокине, као и гена који кодира за индуцибилну азот-оксид синтазу у *in vitro* моделу (Сасо-2, НЕК293). Седма целина приказује да актинидин активира NF-κB сигнални пут *in vitro* (у трансфектованим НЕК293 ћелијама). Осма целина приказује резултате добијене масеном спектрометријом који се односе на идентификацију физиолошких супстрата актинидина у *in vitro* модел систему (Сасо-2).

У **дискусији** је приказана упоредна анализа резултата ове дисертације са литературним подацима у циљу расветљавања молекулског механизма сензитизације на актинидин. Литературни подаци су правилно одабрани, актуелни и релевантни за извођење валидних закључака.

Закључак резимира резултате приказане у овој дисертацији који су јасни и концизни.

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

Литература (216 цитата) поседује релевантне радове који покривају све сегменте ове докторске дисертације.

Б. Кратак приказ резултата

У овој дисертацији је коришћен препарат актинидина, који је добијен изоловањем из плода зеленог кивија. Актинидин је пречишћен коришћењем анјонске и катјонске јоноизмењивачке хроматографије. Чистоћа актинидина је потврђена СДС ПАГ електрофорезом а молекулска маса и примарна структура су потврђени масеном спектрометријом. Протеолитичка активност пречишћеног актинидина је одређена у ензимском есеју са казеином.

Оптимизовани су услови за активацију актинидина инкубацијом протеина у раствору дитиотреитола и у медијуму за узгајање хуманих интестиналних епителних ћелија (у трајању од 60 минута). За детекцију физиолошких супстрата на површини епителних ћелија активација актинидина дитиотреитолом је анализирана масеном спектрометријом. За испитивање утицаја актинидина на интегритет епителне баријере гастроинтестиналног тракта активација ензима је одређена казеинолитичким есејом. Резултати су показали да једночасовна инкубација у медијуму за узгајање ћелија доводи до активације 98% актинидина тј. да је количина цистеина која се налази у медијуму довољна да активира ензим.

Затим, испитиван је ефекат актинидина на пропустљивост интестиналних епителних ћелија *in vivo* (C57BL/6 сој мишева) и *in vitro* (Caco-2 ћелије). Резултати су, у оба модел система, показали да активна форма актинидина нарушава интегритет интестиналне баријере. Употребом *in vivo* (C57BL/6 сој мишева) и *in vitro* (Caco-2 ћелије и дводимензионални (2Д) органоиди добијени из мишјих интестиналних епителних ћелија) модел система показано је да активан актинидин доводи до нарушавања епителне баријере, протеолитички раскидајући протеине међућелијских чврстих веза (*zonula occludens 1* (ZO 1), клаудин 3, Е-кадхерин и оклудин). Такође, у истим модел системима је показан ефекат актинидина на експресију информационе РНК која кодира протеине међућелијских чврстих веза (клаудин 1-4, оклудин, Е-кадхерин, *zonula occludens 1*), проинфламаторних (интерлеукин 1 β (IL-1 β), фактор некрозе тумора α (TNF- α) и интерлеукин 6 (IL-6)) и проалергених цитокина: интерлеукин 33 (IL-33), тимусни стромални лимфопоетин (TSLP) и интерлеукин 25 (IL-25). Са друге стране, исти ефекат је показан и у хуманој ембрионалној ћелијској линији (HEK293): актинидин повећава експресију проалергених цитокина (IL-33, TSLP и IL-25). Такође, актинидин активира интестиналне епителне ћелије (Caco-2 и мишје 2Д органоиде) да производе TNF- α , IL1- β , IL-33, TSLP.

У тестираном *in vitro* модел систему (HEK293 и Caco-2) показано је да активна форма актинидина доводи до повећане експресије информационе РНК која кодира индуцибилну азот оксид синтазу (iNOS).

У овој дисертацији је, по први пут показано да актинидин активира сигнални пут повезан са нуклеарним фактором- κ B (NF- κ B) *in vitro* (у HEK293 ћелијама).

Коришћењем хумане интестиналне ћелијске линије, Сасо-2, и масене спектрометрије утврђено је да су протеини међућелијских чврстих веза физиолошки супстрати за актинидин.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Учесталост алергије на храну је у значајном порасту последњих година и постоји потреба за развој напредних дијагностичких и терапеутских приступа. Такође, превенција и третман алергија на храну захтевају разумевање молекулских механизма који се налазе у основи сензитизације на одређени алергени извор (1). Киви (*Actinidia deliciosa*, Liang Ferguson) је регистрован као извор алергена пре више од 30 година (2). До данас је идентификовано 13 ИгЕ реактивних молекула у кивију од којих је актинидин означен као маркер алерген за моносензитизацију на киви. Изостанак имунолошке реакције на антигене хране означава се као орална толеранција. Промена у толеранцији на протеине хране доводи до процеса сензитизације који је праћен производњом специфичног ИгЕ одговора на ове антигене који се означавају алергенима (3). Актинидин - цистеин протеаза из кивија делимично је отпоран на дигестију у гастроинтестиналном тракту и при том задржава протеолитичку активност, па се сматра да може да изазове процес сензитизације имунолошког система (4).

Тренутно се као вид терапије алергије на киви саветује избегавање овог воћа као и одговарајућа антиинфламаторна терапија која подразумева примену антихистаминика и кортикостероида. Постојећа фармакотерапија не пружа дугорочно ублажавање симптома алергије на храну. Разумевање молекулских основа процеса сензитизације у развоју алергије на храну могао би да унапреди терапијски третман. Наиме, новија истраживања указују да постоји директна комуникација између урођене и адаптивне имуности која је важна за започињање и развој алергије (5). У развоју алергије на храну неопходно је детаљно разумевање молекулских догађаја који доводе до активације урођене имуности и процеса сензитизације.

У овој дисертацији су за испитивање механизма сензитизације на актинидин, и за расветљавање ћелијских и молекулских догађаја, коришћени *in vivo* и *in vitro* модел системи (6,7). Резултати ове дисертације успостављају директну везу између интегритета интестиналне баријере изграђене од епителних ћелија урођене имуности, и протеолитичке активности актинидина. Механизам сензитизације на актинидин није детаљно расветљен, а ови резултати доприносе његовом бољем разумевању. У контакту са протеолитички активним актинидином интестиналне епителне ћелије производе проинфламаторне и проалергене цитокине. Сигнал за њихову активацију може бити нарушавање међућелијских чврстих веза актинидином. Такође, по први пут су употребљени 2Д органоиди добијени из мишијих интестиналних епителних ћелија за испитивање активационог потенцијала актинидина. 2Д органоиди могу бити алтернатива употреби животиња у експерименталне сврхе (8). Активна форма актинидина доводи до повећане експресије информационе РНК цитокина, које синтетишу интестиналне епителне ћелије. Такође, ефекат протеолитичке активности актинидина на експресију информационе РНК за протеине чврстих веза је по први пут, показан на мишијем моделу.

Индубилна азот оксид синтаза има важну улогу у регулацији инфламаторних процеса а њена експресија је, у већини ћелија, снижена при нормалним физиолошким условима. У

присустви алергена њена експресија се повећава (9). Резултати ове дисертације показују да актинидин повећава експресију информационе РНК овог ензима у Сасо-2 ћелијама.

Повећана експресија индуцибилне азот оксид синтазе повезана је са активацијом NF-κB сигналног пута (10). У овој дисертацији је први пут показано да актинидин активира NF-κB сигнални пут *in vitro*.

Такође, показано је да су физиолошки супстрати актинидина компоненте међућелијских веза.

Као финални резултат ових експеримената је разумевање дејства актинидина, алергена хране са протеазном активношћу, на активацију сигналних путева у епителним ћелија гастроинтестиналног тракта који доводе до ослобађања проинфламаторних цитокина, и на тај начин активирају остале компоненте урођене имуности. Поред разумевања молекулских основа активације урођене имуности на моделу алергена хране са протеазном активношћу, ови резултати могу да допринесу развоју нових облика имунотерапије код алергије на храну.

Литература:

1. Sampson HA, O'Mahony L, Burks AW, Plaut M, Lack G, Akdis CA. Mechanisms of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):11–9.
2. Fine AJ. Hypersensitivity reaction to kiwi fruit (Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*). *J Allergy Clin Immunol*. 1981;68(3):235–7.
3. Galand C, Leyva-Castillo JM, Yoon J, Han A, Lee MS, McKenzie ANJ, et al. IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(5):1356–66.
4. Grozdanovic M, Ostojic S, Aleksic I, Andjelkovic U, Petersen A, Gavrovic-Jankulovic M. Active actinidin retains function upon gastro-intestinal digestion and is more thermostable than the E-64-inhibited counterpart. *J Sci Food Agric*. 2014;94(14):3046–52.
5. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(12):751–65.
6. Smit JJ, Noti M, O'Mahony L. The use of animal models to discover immunological mechanisms underpinning sensitization to food allergens. *Drug Discov Today Dis Model*. 2015;17–18:63–9.
7. Gavrovic-Jankulovic M, Willemsen LEM. Epithelial models to study food allergen-induced barrier disruption and immune activation. *Drug Discov Today Dis Model*. 2015;17–18:29–36.
8. van der Wielen N, ten Klooster JP, Muckenschnabl S, Pieters R, Hendriks HF, Witkamp RF, et al. The Noncaloric Sweetener Rebaudioside A Stimulates Glucagon-Like Peptide 1 Release and Increases Enteroendocrine Cell Numbers in 2-Dimensional Mouse Organoids Derived from Different Locations of the Intestine. *J Nutr*. 2016;146(12):2429–35.
9. Hiramoto K, Kobayashi H, Orita K, Sato FE, Ishii M. Inducible nitric oxide synthase plays important roles in allergic reactions of pollinosis in mice sensitized with pollen allergy. *J Clin Biochem Nutr*. 2013;52(1):146–153.
10. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004;75(6):639–53.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

1) Објављени радови

1. **Nešić, A.**, Stam, A., Milena, Č., Paul, J., Klooster, T., & Pieters, R. (2019). Activation of epithelial cells by the major kiwifruit allergen Act d 1 in human and mouse-derived intestinal model. *Journal of Functional Foods* <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103556> (M21, ИФ 2018: 3.197)
2. Milica M Grozdanovic, Milena Cavic, **Andrijana Nešić**, Uroš Andjelković, Peyman Akbari, Joost J Smit, Marija Gavrovic-Jankulovic. Kiwifruit cysteine protease actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects* <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.005> (M21, ИФ 2016: 4.702)

2) Саопштења

1. **Andrijana Nešić**, Annemarie Stam, Milena Čavić, Raymond Pieters, Joost Smit, Marija Gavrović-Jankulović. Employment of mouse-derived intestinal 2D organoids for evaluation of major kiwi-fruit allergen Act d 1 effect on intestinal epithelial cells. Serbian Biochemical Society Ninth Conference. Beograd, 2019 (M64)
2. **Andrijana Nešić**, Milica Popović, Milena Čavić, Joost J Smit, Marija Gavrović-Jankulović. The pro-inflammatory effect of Act d 1, cysteine protease from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), on intestinal epithelial cells *in vitro*. Serbian Biochemical Society Eighth Conference, University of Novi Sad, Serbia, 16. Oktobar, 2018. (M64)

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (*Гласник Универзитета у Београду*, бр. 204/22.06.2018.). На основу провере оригиналности докторске дисертације „**Ефекти протеазне активности актинидина на интегритет ћелија интестиналног епитела**” аутора Андријане Н. Нешић, констатујемо да утврђено подударане текста износи 28 %. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена/звања, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из ове дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, сматрамо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ђ. Закључак

У приложеној докторској дисертацији под насловом „**Ефекти протеазне активности актинидина на интегритет ћелија интестиналног епитела**” кандидат Андријана Н. Нешић је успешно одговорила на постављене циљеве ове дисертације, а који се односе на разумевање дејства актинидина, алергена хране са протеазном активношћу, на активацију сигналних путева у епителним ћелија гастроинтестиналног тракта који доводе до ослобађања проинфламаторних и проалергених цитокина, и на тај начин активирају остале компоненте урођене имуности.

Научно-истраживачки рад кандидата је публикован у оквиру 2 научна рада, која су проистекла из докторске дисертације (**M21 категорије**) Додатно, резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације су саопштени и на два научна скупа од националног значаја.

Комисија сматра да резултати поднети у приложеној докторској дисертацији представљају значајан допринос у области биохемије, јер доприносе разумевању сензитизације на алерген хране са протеазном активношћу. На основу свега изложеног Комисија предлаже Научно-наставном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Андријане Нешић под насловом „**Ефекти протеазне активности актинидина на интегритет ћелија интестиналног епитела**” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Београд, 28.10.2019.

Комисија:

др Марија Гавровић-Јанкуловић
Редовни професор, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Милица Поповић
Доцент, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Др Милена Чавић
Виши научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд,