

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Luka D. Mihajlović

**Efekti polifenolnih molekula i fenol oksidaza  
na strukturu i imunološka svojstva alergena**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Luka D. Mihajlović

**Effects of polyphenolic compounds and  
phenol oxidases on the structure and  
immunological properties of allergens.**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

### **Članovi Komisije:**

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, Institut za imunologiju i virusologiju Torlak

Datum odbrane: 11.12.2015.

## Naziv: Efekti polifenolnih molekula i fenol oksidaza na strukturu i imunološka svojstva alergena

### Izvod

Fenolna jedinjenja su velika i raznovrsna grupa supstanci, čiji efekti na biološke sisteme nisu detaljno ispitani. Fenolna jedinjenja su pokazala brojne i raznovrsne biološke efekte u mnogim studijama, od kojih neke pokazuju značajne imunomodulatorne efekte koje ova jedinjenja ostvaruju.

Deo ove teze obrađuje razvoj novih protokola za ekstrakciju fenolnih jedinjenja, kao i analizu i identifikaciju fenolnih jedinjenja iz prehrambenih izvora alergena. Pored toga, po prvi put je određen fenolni sastav polena *A. artemisiifolia*, kao i fenolni sastav ekstrakta subpolenskih čestica. Utvrđeno je da su glavne fenolne komponente polena mono-glikozidi i malonil-monoglikozidi flavonola, uglavnom kvercetina i kempferola. Detektovano je i nekoliko poliaminskih jedinjenja. Poređenje fenolnog sastava polena ambrozije i subpolenskih čestica polena pokazuje smanjenje koncentracije polifenola, kao i odsustvo viših glikozida.

Umrežavanje menja biološka i imunološka svojstva proteina. Ispitivan je dejstvo polifenol oksidaze lakaze na umrežavanje proteina kikirikija i sastav fenolnih jedinjenja. Tretman ekstrakta kikirikija lakazom daje kovalentno umreženi materijal velike molekulske težine, sa promenama u tercijarnoj strukturi proteina i poboljšanom bioraspoloživošću određenih alergena. Tretman lakazom dovodi do taloženja ili inkorporacije većine fenolnih jedinjenja iz smeše, sa izuzetkom izoramnetina i procijanidina B. Tretman kompleksnih ekstrakata bogatih polifenolima dovodi do umrežavanja proteina, kao i do promena u fenolnom sastavu.

Novija istraživanja ukazuju na dodatne uloge koje subpolenske čestice mogu imati u razvoju teških oblika alergijske astme. Poređenje proteinskog sastava ukupnog ekstrakta polena ambrozije, ekstrakta subpolenskih čestica i standardnog dijagnostičkog ekstrakta je izvedeno korišćenjem tehnika "shotgun" proteomike i analize 2D gelova. Ustanovljeno je postojanje jasnih razlika medju uzorcima, koja se ogleda pre svega u visokoj koncentraciji Amb a 4 (Art v 1 homologa) u ekstraktu subpolenskih čestica, kao i profilina, koji su visoko zastupljeni u ukupnom ekstraktu. Ovi rezultati dodaju našim saznanjima o alergiji i potencijalnoj ulozi koje subpolenske čestice mogu imati u razvoju alergija, ali su i od neposrednog praktičnog značaja za razvoj boljih metoda laboratorijske dijagnostike.

**Ključne reči:** fenoli / proteini kikirikija / umrežavanje proteina / lakaza / Ambrosia /subpolenske čestice

**Naučna oblast:** Prirodno-matematičke nauke

**Uža naučna oblast:** Biohemija

**UDK broj:** 577.112

**Title: Effects of polyphenolic compounds and phenol oxidases on the structure and immunological properties of allergens****Abstract**

Phenolic compounds are a large and varied group of substances, whose effects on living systems have not been investigated in depth. Phenolic compounds have shown numerous and diverse biological effects in many studies, some of which show significant immunomodulatory effects of these compounds.

One part of this thesis was the development of novel protocols for extraction of phenolic compounds as well as the analysis and identification of phenolic compounds from dietary sources of allergens. In addition, phenolic composition of *Ambrosia* pollen and subpollen pollen extracts was determined for the first time.

We determined that the main components of water-soluble pollen phenolics are monoglycosides and malonyl-monoglycosides of flavonols, mostly quercetin and kaempferol. Several polyamine compounds have also been identified. Comparison of phenolic composition of *Ambrosia* pollen and subpollen particles shows a reduction in polyphenol content, as well as an absence of higher glycosides.

Cross-linking changes biological and immunological properties of proteins. We investigated the effect of laccase, a polyphenol oxidase, on peanut protein cross-linking and composition of phenolic compounds. Laccase treatment of peanut proteins yielded covalently cross-linked material of high molecular weight, with modified tertiary structure of peanut proteins and improved bioavailability of

certain allergens. Laccase treatment depleted most phenolic compounds from the mixture, with the exception of isorhamnetin and procyanidin B. Treatment of complex food extracts, rich in polyphenols, by laccase results in both protein cross-linking and modification of polyphenol compounds.

Recent findings suggest additional roles for subpollen particles in development of severe forms of allergic asthma. A comparison of protein composition of total *Ambrosia* pollen extract, *Ambrosia* subpollen particles extract and a standard diagnostic extract was performed by shotgun proteomics and 2D gel imaging. Definitive differences were noted, most notably a high concentration of Amb a 4 (Art v 1 homologue) in the subpollen particles extract, as well as a comparatively higher amount of profilins present in the total extract. These results add to our knowledge on allergies and the potential role of subpollen particles in allergy development, but are also of direct practical importance for development of better allergy diagnostics.

**Keywords:** fenoli / proteini kikirikija / umrežavanje proteina / lakaza / *Ambrosia* /subpolenske čestice

**Scientific field:** Life sciences

**Scientific discipline:** Biochemistry

**UDK number:** 577.112

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b><u>UVOD</u></b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b><u>OPŠTI DEO</u></b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>ALERGIJA</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>ALERGENI</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>KLINIČKI SIMPTOMI ALERGIJE</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4</b>	<b>UZROCI NASTAJANJA ALERGIJA</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5</b>	<b>IMUNOTERAPIJA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6</b>	<b>POLEN AMBROZIJE</b> .....	<b>13</b>
<b>2.7</b>	<b>LAKAZA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.8</b>	<b>FENOLNA JEDINJENJA</b> .....	<b>15</b>
2.8.1	FENOLNE KISELINE .....	15
2.8.2	FLAVONOIDI .....	16
<b>2.9</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b><u>ANALIZA FENOLNOG SASTAVA</u></b> .....	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>FENOLNI SASTAV POLENA I SUBPOLENSKIH ČESTICA <i>AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA</i></b> .....	<b>19</b>
3.1.1	UVOD .....	19
3.1.2	MATERIJAL I METODE .....	20
3.1.3	REZULTATI I DISKUSIJA .....	24
<b>3.2</b>	<b>FENOLNI SASTAV LAKAZOM TRETIRANOG EKSTRAKTA KIKIRIKIJA</b> .....	<b>31</b>
3.2.1	UVOD .....	31
3.2.2	MATERIJAL I METODE .....	31
3.2.3	REZULTATI I DISKUSIJA .....	33
<b>3.3</b>	<b>FENOLNI SASTAV ZELENOG ČAJA</b> .....	<b>35</b>
3.3.1	UVOD .....	35
3.3.2	MATERIJAL I METODE .....	36
3.3.3	REZULTATI I DISKUSIJA .....	37
<b>3.4</b>	<b>FENOLNI SASTAV KORE JABUKE</b> .....	<b>40</b>
3.4.1	UVOD .....	40
3.4.2	MATERIJAL I METODE .....	40
3.4.3	REZULTATI I DISKUSIJA .....	42
<b>4</b>	<b><u>ENZIMSKO UMREŽAVANJE PROTEINA KIKIRIKIJA</u></b> .....	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>OPTIMIZACIJA REAKCIJA UMREŽAVANJA</b> .....	<b>45</b>



4.1.1	UVOD.....	45
4.1.2	MATERIJAL I METODE.....	45
4.1.3	REZULTATI I DISKUSIJA.....	46
<b>4.2</b>	<b>KARAKTERIZACIJA PROTEINA KIKIRIJA DOBIJENIH DEJSTVOM LAKAZE .....</b>	<b>47</b>
4.2.1	UVOD.....	47
4.2.2	MATERIJAL I METODE.....	49
4.2.3	REZULTATI.....	52
4.2.4	DISKUSIJA.....	56
<b>5</b>	<b><u>KOMPARATIVNA ANALIZA PROTEOMA <i>AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA</i> POLENA I SUBPOLENSKIH ČESTICA .....</u></b>	<b>59</b>
5.1.1	UVOD.....	59
5.1.2	MATERIJAL I METODE.....	59
5.1.3	REZULTATI I DISKUSIJA.....	63
<b>6</b>	<b><u>ZAKLJUČCI .....</u></b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b><u>REFERENCE.....</u></b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b><u>BIOGRAFIJA.....</u></b>	<b>75</b>

## 1 Uvod

Alergije su medju najrasprostranjenijim oboljenjima modernog sveta. I pored visoke prevalence alergijskih oboljenja, tačni uzroci nastanka alergija su i dalje nepoznati, i nove teorije koje pretenduju da objasne uzrok ovog poremećaja se relativno često mogu pronaći u referentnim časopisima.

Poznato je da slobodni radikali u manjoj ili većoj meri doprinose nastanku velikog broja oboljenja, od kojih su neka (kao što je na primer astma ili dijabetes tipa I) vezana za funkcionisanje imunog sistema(Rastogi and Singh 2001).

Uloga antigenih proteina polena u indukciji alergijskih zapaljenja disajnih puteva je dobro poznata. Nasuprot tome, doprinos ostalih sastojaka polenskih zrna je u velikoj meri nepoznanica. Polen sadrži enzim NADPH oksidazu, čija biološka uloga je bitna za razvoj korenskih dlačica i rast polenske cevi, kao i za odbranu od mikroorganizama. Dokazano je da ova oksidaza u kontaktu sa plućnim epitelom dovodi do povećanja koncentracije oksidovanog glutationa, kao i drugih proizvoda oksidativnog stresa. NADPH oksidaze, zajedno sa pomenutim proizvodima oksidativnog stresa dovode do regrutacije neutrofila i započinjanja alergijske reakcije. Novije teorije o nastanku respiratornih alergija pretpostavljaju mehanizam u kom je prvi signal za alergiju generisan polenskim NAPDH oksidazama, dok prisustvo klasičnih polenskih alergena pojačava zapaljenje disajnih puteva i dovodi do potpunog alergijskog odgovora(Boldogh, Bacsı et al. 2005) Utvrđeno je da inhibicija tzv. prvog signala primenom antioksidanasa dovodi do umanjenja intenziteta alergija indukovanih polenom ambrozije (Dharajiya, Boldogh et al. 2008).

Činjenica je da je prevalenca alergijskih oboljenja u gradskim sredinama veća nego u ruralnim sredinama, kao i da dosadašnje teorije o nastanku alergija ne daju potpune odgovore na pitanje zašto je to tako(Taksey and Craig 2001; Peternel, Music Milanovic et al. 2008). Kako je gradska sredina specifična mikrosredina sa različitim uticajima potrebno je sistematski ispitati moguće uzroke, radi preduzimanja odgovarajućih preventivnih ili terapijskih mera.

Usled sagorevanja fosilnih goriva, blizine industrije, fotodisocijacije različitih hemikalija (najbitniji primer je azot dioksid, koji nastaje sagorevanjem benzina u motorima sa unutrašnjim sagorevanjem), prisustva povećane koncentracije ozona itd. u gradskoj sredini se nalaze

značajno veće količine slobodnih radikala nego u netaknutoj prirodi ili u ruralnoj sredini(Sklorz, Briede et al. 2007).

Iz tog razloga pristupilo se daljem ispitivanju pretpostavke da oksidativni stres može imati udela u nastanku alergije.

Pretpostavljeno je da u prisustvu povećane količine slobodnih radikala može doći do nastanka neoalergena usled reakcije određenih klasa haptena sa proteinima domaćina, prvenstveno proteina respiratornih barijera i digestivnog epitela.

Ambrozija je vrlo rasprostranjena biljka, koja je uzročnik najvećeg broja polenskih alergija u Evropi i Severnoj Americi. Ambrozija ima izuzetno sitan polen, koji lako može da dospe u gradsku sredinu, gde je izložen oksidativnom delovanju izduvnih gasova, različitih aerosola itd. Osim toga, ovaj polen je bogat različitim fenolima, čija alergena svojstva su nedovoljno ispitana. Utvrđeno je da fenoli imaju vrlo različite i ponekad dramatične efekte na imuni sistem(Gong and Chen 2003; Akiyama, Sato et al. 2005; Franova, Nosalova et al. 2007). Alergena svojstva fenola, ili haptena nastalih od fenola nisu opisana u literaturi.

## 2 Opšti deo

### 2.1 Alergija

Alergija je poremećaj imunog sistema koji je izazvan reakcijom organizma na supstance iz okoline koje se nazivaju alergeni. Alergija predstavlja neadekvatan odgovor imunog sistema na neki antigen iz spoljne sredine, koji rezultuje specifičnim tipom imunog odgovora, posredovanog mastocitima i IgE antitelima.

Alergija pripada prvom od 4 glavna tipa reakcija preosetljivosti imunog sistema (Coombs 1963).

**Tip I ili rana preosetljivost** se karakteriše produkcijom IgE antitela na strane proteine koji su uobičajeni u spoljašnjoj sredini, te ne predstavljaju imunološki “napad” na domaćina. To mogu biti npr. polen, grinje, proteini voća itd.. Unakrsno povezivanje antitela na senzibilisanom IgE receptoru na mastocitima dovešće do momentalnog otpuštanja histamina, i postepenog oslobađanja drugih medijatora, kao što su leukotrijeni i citokini. Primeri rane preosetljivosti su polenska groznica, astma, atopični dermatitis i anafilaksa.

**Tip II ili antitelima posredovana alergija na hranu** se dešava kada se protiv površinskih antigena ćelija samog organizma proizvode antitela IgM ili IgG izotipa. Ova antitela mogu da pokrenu citotoksične reakcije aktivirajući komplement ili pospešujući vezivanje ćelija prirodnih ubica (NK ćelije). Primer ovakvog odgovora je autoimuna hemolitička anemija.

**Tip III ili bolest imunih kompleksa** se dešava kada se iz različitih razloga u telu talože veće količine imunih kompleksa (kompleksa antitelo-antigen) koji različiti “scavenging” mehanizmi (a prvenstveno makrofagi) ne mogu da otklone. Lokalna akumulacija kompleksa dovodi do aktiviranja sistema komplementa, ili do aktiviranja ćelijskog imunog odgovora.

**Tip IV ili ćelijama posredovane reakcije** su one u kojima su specifične T ćelije efektorske ćelije. Najpoznatiji primeri ove vrste preosetljivosti su Hašimotova bolest i kontaktni dermatitis.

## 2.2 Alergeni

Alergen se može definisati kao antigen koji može da izazove alergijsku reakciju.

Alergeni mogu biti uneti u organizam na više načina, pa se generalno mogu podeliti na: alergene nošene vazduhom (kao što su polen, prašina, životnjska dlaka, spore gljiva), parenteralne alergene (npr. otrov insekata, vaccine), kontaktne alergene (npr. lateks, neke hemikalije) i alergene hrane (npr. breskva, banana, kivi)(Moffatt, Hill et al. 1994)

Pri prvom izlaganju alergen izaziva senzibilizaciju, što podrazumeva stvaranje imunoglobulina E specifičnih za dati alergen koji se vezuje za receptor visokog afiniteta na mastocitima i njima srodnim bazofilima.

Mast ćelije su neophodne za razvoj alergijskih reakcija, ali imaju ulogu i kod razvoja urođenog i stečenog imuniteta, kao i kod razvoja inflamatornih bolesti. (Galli, Nakae et al. 2005) Unakrsno povezivanje IgE receptora (Fc imunoglobulin E receptori, FcεRI, CD32) multivalentnim alergenima na mast ćelijama rezultuje u sekreciji medijatora iz granula(Kandere-Grzybowska, Kempuraj et al. 2006).

Osim toga, dolazi do sinteze i oslobadjanja proinflamatornih citokina i tkivnih medijatora zapaljenja, što dovodi do lokalne infiltracije drugim ćelijama i inflamacije.

## 2.3 Klinički simptomi alergije

Sezonski rinitis je najčešći atopijski poremećaj, koji se javlja u određeno doba godine, kada su aeroalergeni rasprostranjeni u vazduhu. Najčešća stanja vezana za alergijski rinitis su polenska groznica, alergijska astma i ekcem. (Platts-Mills and Chapman 1987)

U najtežim slučajevima, usled ekstremno snažnog odgovora na alergen može doći do anafilaktičkog šoka, gde usled edema mekih tkiva dušnika i vazodilatacije može doći do obstrukcije disajnih puteva i gušenja.

## 2.4 Uzroci nastajanja alergija

O uzrocima nastajanja alergija postoji nekoliko teorija, od kojih je najbitnije spomenuti takozvanu "higijensku hipotezu".

Higijensku hipotezu je prvi predložio Strachan, 1989 godine uočivši vezu između rasprostranjenosti alergija i higijenskih uslova.(Strachan 1989)

Alergijska oboljenja su izazvana neodgovarajućim imunim odgovorom na bezopasne antigene putem Th2 usmerenog imunog odgovora. Mnogi virusi i bakterije izazivaju Th1

odgovor, koji dovodi do supresije Th2 odgovora. Prvi predloženi mehanizam dejstva "higijenske hipoteze" predlaže da nedovoljna stimulacija Th1 grane imunog odgovora dovodi do prejakog Th2 odgovora, što zauzvrat vodi u alergijsku bolest (Folkerts, Walzl et al. 2000).

Ovaj mehanizam, međutim, ne može da objasni porast incidence nekoliko autoimunih bolesti koje su vezane za Th1 odgovor, kao što su multipla skleroza, inflamatorna bolest creva i dijabetes tipa 1. Glavno alternativno mehanističko objašnjenje je da imuni sistem u razvoju mora da primi stimulse (od infektivnih agenasa, simbiotskih bakterija, parazita itd.) kako bi se na adekvatan način razvile regulatorne T-ćelije, ili će biti osetljiviji na autoimune i alergijske bolesti usled nedovoljno razvijenih Th1 i Th2 odgovora (Guarner, Bourdet-Sicard et al. 2006).

Higijenska hipoteza obuhvata i interakciju čoveka sa mikroorganizmima i parazitima kojim je bio izložen tokom velikog dela evolutivne istorije, i shvata ih kao neophodan deo razvoje balansiranog i regulisanog razvitka imunog sistema. Tokom poslednjih 50 godina razvoj higijene i efektivne medicinske nege je smanjio ili eliminisao izloženost ovim mikroorganizmima tokom razvoja. Neki od mikroorganizama koji su verovatno od važnosti za pravilno sazrevanje T regulatorni ćelija su laktobacili, različite mikobakterije i helminti (Rook and Brunet 2005).

Novija ispitivanja pokazuju da i oksidativni stres može imati uticaja pri nastanku alergija, sa posebnim fokusom na respiratorne alergije. Hipoteza "2 signala" pretpostavlja da je za nastanak respiratorne alergije neophodno prisustvo slobodnih radikala, koji su nastali dejstvom polenske NADPH oksidaze ili su bili prisutni u spoljnoj sredini. Slobodni radikali sačinjavaju tzv. prvi signal, dok prisustvo "klasičnih" respiratornih alergena dovodi do nastanka potpuno razvijenog alergijskog odgovora.

Još jedna, relativno malo poznata hipoteza (ali zanimljiva u kontekstu teme ove disertacije) je tzv. "hlorna hipoteza", koju je prvi postavio Fjellbirkeland 1995. godine, a proširio Bernard, koji tvrdi da je dugotrajna izloženost zatvorenim bazenima jedan od glavnih faktora rizika za nastanak astme kod dece od 6-7 godina u bogatim zemljama. (Bernard, Carbonnelle et al. 2003). Pretpostavljeni mehanizam podrazumeva povećanje permeabilnosti alveorano epitela, što bi u dužem vremenskom periodu omogućilo alergenima da prodju kroz ovu barijeru i izazovu atopijski odgovor (Bernard, Carbonnelle et al. 2003).

Sem toga, utvrđeno je da postoji snažna nasledna osnova alergijskih oboljenja.. Zanimljivo je da se osetljivost na određeni alergen ne nasledjuje. Tako na primer, ako su roditelji alergični na polen lipe, deca mogu da budu osetljiva na npr. kikiriki. Pretpostavlja se da se nasledjuje opšta predispozicija ka alergiji (tzv. atopička konstitucija), dok reakcije na pojedine alergene zavise od uslova sredine (De Swert 1999).

## 2.5 Imunoterapija

Imunoterapija (specifična desenzitizacija) je u upotrebi oko 80 godina kao forma tretmana pacijenata sa alergijskim oboljenjima. Ovaj tretman obezbeđuje izvesnu zaštitu protiv efekata izlaganja prirodnim alergenima. Proces se često zove desenzitizacija ili specifična hiposenzibilizacija, a sprovodi se aplikacijom malih doza alergena i „obučavanjem“ imunog sistema na pravilan odgovor. Pored pozitivnih efekata koje imunoterapija donosi mogu da se jave i neželjene posledice (čak i anafilaktički šok) u grupi izrazito osetljivih pacijenata. Da bi se umanjio rizik od neželjenih (ponekad i fatalnih) reakcija na imunoterapiju, prešlo se na alternativne načine administracije alergena. Razvijene su: oralna (OIT), sublingvalna (SLIT), lokalna nazalna (LNIT), lokalna bronhijalna imunoterapija (LBIT). Do sada su za imunoterapiju korišćene smeše alergena (npr. pun polenski ekstrakt), što nosi veliki rizik od senzitivacije pacijenta nekim drugim alergenom, na koji do tada nije reagovao.

Sa razvojem molekulske alergologije, pojavljuje se sve više čistih ili rekombinantnih alergena. Ova terapija podrazumeva injektovanje čistih alergena, što značajno umanjuje rizik od pojave neželjenih efekata imunoterapije, ali nažalost povlači za sobom i značajno veću cenu tretmana (Norman 1980; Nagata 2005).

## 2.6 Polen ambrozije

Polen je pre 150 godina prepoznat kao vodeći uzrok bolesti kod atopičnih osoba. Alergije na polen, koje se nazivaju i sezonski alergijski rinitis ili polinitis su od medicinskog kurioziteta prerasle u najrasprostranjeniji i klinički najvažniji uzrok alergijskih bolesti (King 1976).

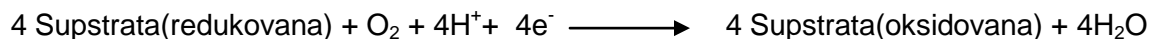
Familija Helinatheae (suncokreti) sadrži rod *Ambrosia*, čiji pripadnici su široko rasprostranjene anemofilne vrste koje izazivaju najsnažnije alergijske reakcije od svih poznatih biljaka. Različite vrste ovog roda su glavni uzrok polinoze u Severnoj Americi, gde je *Ambrosia artemisifolia* odgovorna za veći broj slučajeva alergijskog rinitisa i srodnih bolesti od svih ostalih biljaka uzetih zajedno. Ekstremno mala veličina zrna polena ove biljke omogućava mu da bude nošeno vetrom hiljadama kilometara, tako da su alergije na *Ambrosia* česte i u Centralnoj i Južnoj Americi, kao i kontinentalnoj Evropi, Mediteranu, pa čak i u Aziji. Različiti ekosistemi i klimatski uslovi koje naseljava omogućavaju ovoj biljci da polinira u različitim periodima godine, što izaziva povećano izlaganja ljudi, i rezultuje u senzitivaciji još većeg procenta populacije (Frenz, Palmer et al. 1995).

Pokazano je da kompleksna smeša proteina koja se oslobadja iz zrna polena ambrozije sadrži neke od najjačih poznatih antigena-alergena. Od 52 antigena koji su izolovani iz vodenog ekstrakta polana ambrozije bar 22 su alergeni na osnovu reaktivnosti sa humanim IgE (Bagarozzi and Travis 1998).

## 2.7 Lakaza

Lakaze (EC 1.10.3.2.) su enzimi koji sadrže nekoliko atoma bakra i pripadaju porodici tzv. plavih oksidaza. Najizučavanije su oksidaze poreklom iz gljiva i biljaka, ali su ovi enzimi nadjeni i u bakterijama i nekim insektima. Lakaze katalizuju oksidaciju većeg broja organskih i neorganskih jedinjenja. Tipični organski supstrati su aromatična jedinjenja, kao što su različiti fenoli, anilini i benzentoli (Xu 1996).

Lakaze katalizuju jednoelektronske (slobodnoradikalske) oksidacije, uz redukciju molekularnog kisonika do vode, po reakciji: lakaza



Tokom reakcije nastaju slobodni radikali koji su izrazito reaktivni i daju posebne osobine reakcijama koje su katalizovane ovim enzimom. Lakaza dovodi do stvaranja polimera molekula supstrata, koji mogu biti homo ili heteropolimeri. Lakaza može da katalizuje reakciju oksidacije proteina, ali je nastanak polimera otežan bez postojanja "linker" molekula, koji može biti bilo koji niskomolekulski supstrat lakaze (Mattinen, Kruus et al. 2005).

Predloženo je da lakaze imaju ulogu u formiranju lignina, promocijom oksidativnog kuplovanja lignola, porodice fenola iz biljaka. Enzimski aktivna forma lakaze može biti i u obliku dimera i trimera, dok sam enzim ima mogućnost izgradnje autopolimera (Solomon, Sundaram et al. 1996).

Lakaze su jedna od retkih klasa oksidoreduktaze koje su u upotrebi kao industrijski katalizatori. Ispitana je mogućnost njihove upotrebe u gorivnim ćelijama, gde služe kao medijatori elektronskog transfera do metalnog provodnika. Enzim se koristi za bojenje i izbeljivanje tekstila, u izradi čepova od plute za vinske flaše, kao i za mnoge druge upotrebe u industriji nauci o životnoj sredini, dijagnostici itd (May 1999).

Kao i za većinu enzima, najlakši način za detekciju i kvantifikaciju je spektrofotometrijski, uz upotrebu supstrata kao što su ABTS, 2,6-dimetoksifenol i dimetil-p-fenildiamin. Aktivnost se



može pratiti i kiseoničnom elektrodom, jer je oksidacija supstrata kuplovana za redukciju kiseonika do vode (Xu 1996; Mattinen, Hellman et al. 2006).

## 2.8 Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja su velika i raznovrsna grupa supstanci, čija je zajednička osobina prisutvo jednog ili više fenolnih jezgara u strukturi molekula. U višim biljkama je identifikovano više hiljada različitih fenolnih jedinjenja, dok se u različitim namirnicama može pronaći više stotina jedinjenja. Glavna funkcija ovih jedinjenja u biljkama je odbrambena – imaju ulogu u zaštiti od UV zračenja, kao i u odbrani od patogeni.

Fenolna jedinjenja se mogu klasifikovati u: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane, na osnovu broja fenolnih prstenova, kao i prirode veze između prstenova. Osim raznovrsnosti osnovnih struktura, daljoj raznovrsnosti doprinosi i vezivanje fenolnih jedinjenja za ugljene hidrate, organske kiseline itd.

Različita fenolna jedinjenja pokazuju anti-alergijske, anti-arterogene, antiinflamatorne, antimikrobne, antioksidansne, antikoagulantne, kardioprotektivne i vazodilatatorne efekte (Manach, Mazur et al. 2005; Silva, Gomes et al. 2008; Sekhon-Loodu, Ziaullah et al. 2015), a poznato je i ispoljavaju brojne i raznovrsne efekte na komponente imunskog sistema. Vredi napomenuti da u velikom broju slučajeva postoje razlike u intenzitetu efekata pokazanih u laboratoriji i različitih populacionih i kliničkih studija, te da se pretpostavlja da bioraspoloživost, matriks hrane i drugi faktori mogu uticati na diskrepancu između laboratorijskih rezultata i kliničkih studija (Middleton, Kandaswami et al. 2000)

### 2.8.1 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su klasa jedinjenja koja se, pored fenolnog jezgra odlikuje prisustvom karboksilne grupe. Mogu se podeliti na derivate benzojeve i derivate cimetine kiseline. Derivati benzojeve kiseline su čest sastojak hrane, iako prisutne u malim količinama. Mogu se naći u većim količinama u luku, rotkvi i crvenom voću. Hidroksibenzojeve kiseline su su komponente složenih struktura, kao što su hidrolizabilni tanini. Derivati cinamske kiseline se znatno češće sreću u prirodi, iako retko u slobodnoj formi. Najbitniji predstavnici su p-kumarinska, kafeična i kumarinska kiselina. Vezane forme su glikozilovani derivati ili estri kiselina, šikamne kiseline i vinske kiseline. Nalaze se u većim količinama u borovnicama, kiviju, šljivama itd. Ova jedinjenja pokazuju antioksidativna svojstva in vitro i pretpostavlja se da protektivno deluju na kardiovaskularni sistem i prevenciju kancera.

### 2.8.2 Flavonoidi

Flavonoidi dele zajedničku strukturu koja se sastoji od 2 aromatična prstena (A i B) koje su vezani preko 3 C-atoma koji formiraju prsten C. Flavonoidi se mogu dalje podeliti na 6 podklasa - flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocijanidine i flavanole (katehini i proantocijanidini), na osnovu strukture prstena C. Flavonoli su najzastupljeniji flavonoidi u hrani, a glavni predstavnici su kvercetin i kempferol. Najbogatiji izvori su luk, praziluk, brokoli, i borovnica. Ova jedinjenja su najčešće prisutna u glikozilovanom obliku, a najčešće su derivatizovani glukozom ili ramnozom.

Mnoga jedinjenja iz ove klase pokazuju jasne zdravstvene dobrobiti pri redovnom unosu, a pokazano je da pored antioksidantnog dejstva mnogi flavonoidi ostvaruju funkciju kroz inhibiciju enzimske aktivnosti. Ova jedinjenja inhibiraju ili modulišu efekte nekih 50 enzima uključenih u kritične signalne putanje sisarskog metabolizma, kao što su ćelijsko preživljavanje i proliferacija, ekspresija gena i metabolizam nukleinskih kiselina, anabolizam i katabolizam makromolekula i ćelijsku signalizaciju.

Pretpostavlja se da su proteinske tirozin kinaze jedna od glavnih ćelijskih meta flavonoida. Medju proteinima od značaja na koje flavonoidi deluju inhibitorno ili modulatorno se nalaze i protein kinaza C, mitogen aktivirana protein kinaza (MAPK), različite fosfolipaze, lipooksigenaze i ciklooksigenaze. Rezultanta ovih dejstava dovodi do antiinflamatornih efekata na imunskim ćelijama (Gomes, Fernandes et al. 2008). Flavonoidi mogu da izmene funkcionalnost praktično svih imunskih ćelija, uključujući T i B limfocite, NK ćelije, makrofazi, mast ćelije i neutrofile (Middleton, Kandaswami et al. 2000). Tako, na primer, genistein inhibira proliferaciju T ćelija i sintezu IL-2 i IL-2 receptora, dok kvercetin dovodi do smanjenja lučenja histamina pri stimulaciji mast ćelija (Middleton 1986).

Flavanoli se u prirodi mogu naći u monomernom ili polimernom obliku. Monomerni flavanoli se nazivaju katehini, dok polimerne nazivamo proantocijanidinima. Katehini se nalaze u mnogim vrstama voća (kajsije, koje sadrže 250 mg / kg sveže mase, su najbogatiji izvor). Mogu se naći i u crvenom vinu, kao i u zelenom čaju. Katehin i epikatehin su glavni flavanoli u voću, dok se galokatehin, epigalokatehin, i epigalokatehin galat mogu naći u groždju i čaju. Za razliku od drugih klasa flavonoida, flavanoli nisu glikozilovani u hrani. Kao i flavonoidi, ostvaruju brojne i kompleksne biološke efekte. Pokazano je da katehin olakšava simptome u eksperimentalnom modelu artritisa (Lee, Huh et al. 2009), kao i da utiče na koncentraciju NO i ROS u organizmu (Stefanescu, Matache et al. 2001)

Proantocijanidini su oligomeri ili polimeri katehina. Kroz formiranje kompleksa sa proteinima pljuvačke, kondenzovane tanini su odgovorni za astringentni karakter različitih namirnica i za gorčina čokolade. Ova jedinjenja su snažni oksidansi i studije su pokazale protektivne efekte za kardiovaskularni sistem i prevenciju kancera (Huang, Pan et al. 2015).

## 2.9 Ciljevi istraživanja

1. Izolacija i karakterizacija fenolnih jedinjenja poreklom iz respiratornih alergeni izvora: polen ambrozije i subpolenskih čestica polena ambrozije
2. Izolacija i karakterizacija fenolnih jedinjenja poreklom iz izvora nutritivnih alergena: jabuka, zeleni čaj i kikiriki
3. Sinteza i karakterizacija lakazom umreženih proteina kikirikija.
4. Usporedna analiza proteoma polena ambrozije, subpolenskih čestica i standardnog ekstrakta ambrozije

### 3 Analiza fenolnog sastava

#### 3.1 Fenolni sastav polena i subpolenskih čestica *Ambrosia artemisiifolia*

##### 3.1.1 Uvod

Proteinski sastav polena je već dugi niz godina predmet opsežnih istraživanja. U poslednjih 10 godina sve više pažnje se posvećuje proteinskom sastavu i alergenicim osobinama subpolenskih čestica (Bacsi, Choudhury et al. 2006), ali jako mali broj radova obradjuje tematiku fenolnog sastava i imunoloških svojstava fenola subpolenskih čestica. Sadržaj malih molekula u polenu i subpolenskim česticama *A. artemisiifolia* do sada nije analiziran, i pored velikog broja radova koji obradjuju različita imunomodulatorna svojstva fenola iz drugih izvora.

Tačna identifikacija fenolnih jedinjenja može predstavljati kompleksan zadatak zato što uzorci mogu sadržati veliki broj različitih struktura (Ferrerres, Oliveira et al. 2014), kao i veliki broj derivata sa istim osnovnim planom molekula. HPLC/ESI-MS-MS se pokazala kao koristan alat u rešavanju ovog problema, zato što maseni spektrometri bez mogućnosti fragmentacije ne mogu da daju podatke koji bi omogućili razlikovanje supstanci iste molekulske težine, a različitih struktura (Quirantes-Pine, Lozano-Sanchez et al. 2013)

Poznato je da su polifenolna i poliamidna jedinjenja prisutna u većini biljnih tkiva (uključujući i polen), što je posledica njihovih brojnih bioloških funkcija u biljci. Većina radova koja obradjuje tematiku fenolnog sastava polena kao početni materijal koristi polen koji su skupljale medonosne pčele, dok je fokus ovih istraživanja smešten na zdravstvene karakteristike preparata polena ili geografsku determinaciju porekla. Ovaj pristup nije moguć u slučaju *A. artemisiifolia*, jer se polen ove vrste prenosi vetrom. Osim toga, polen koji su skupljale pčele je u većini slučajeva smeša polena nekoliko biljnih vrsta. Glavni fenolni konstituenti polena su flavonoidni glikozidi kvercetin, izoramnetin, kampferol, kao i različiti manje okarakterisani derivati (Negri, Teixeira et al. 2011).

Fenoli imaju sposobnost modulacije imunskog odgovora, i mogu imati ulogu u alergijskoj reakciji na polen (Yoon, Lee et al. 2006). Vezivanje alergena za IgE može biti izmenjeno uticajem flavonoida vezanih za ćelijsku membranu (Hendrich 2006), dok je direktna interakcija alergena sa biološki važnim flavonoidima već pokazana (Martinez-Sanchez, Gil-Izquierdo et al. 2008; Stojadinovic, Radosavljevic et al. 2013). Pored toga, pokazano je da poliamidi, osim inherentne toksičnosti, takodje mogu doprineti supresiji imunoloških reakcija u plućima (Hoet and Nemery 2000). Utvrđivanje detaljnog sastava ovih jedinjenja u subpolenskim česticama je važan zadatak, sa perspektivom u ublažavanju alergijskih simptoma. Tokom ovog dela istraživanja razvijena je nova procedura za ekstrakciju fenola i poliamida iz polena i

subpolenskih čestica, kao i brz i robustan metod za detekciju korišćenjem UHPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS-MS.

### 3.1.2 Materijal i metode

#### 3.1.2.1 Hemikalije i standardi

Korišćeni su organski rastvarači J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA). Fetalni govedji albumin, L-glutamin, penicilin, streptomycin, gentamicin i 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) su nabavljeni od Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Ultračista voda HPLC razreda čistoće (18 mΩ) je pripremana u Smart2Pure3™ sistemu za prečišćavanje vode (ThermoFisher Scientific, MA, USA).

#### 3.1.2.2 Uzorci polena

Polen *A. artemisiifolia* L. je dobavljen od Instituta za Virologiju, Vakcine i Serume "Torlak" iz Beograda. Polen je prikupljan u okolini Beograda tokom letnje sezone 2012 godine.

#### 3.1.2.3 Procedure ekstrakcije i izolacije u vodi rastvornih fenola polena i subpolenskih čestica

Glavni cilj ovog segmenta istraživanja je pripremanje i karakterizacija vodenog ekstrakta fenola polena i subpolenskih čestica *A. artemisiifolia* L. pod uslovima koji će oponašati prirodne uslove nastanka subpolenskih čestica. Naime, subpolenske čestice se oslobadjaju tokom kontakta polena sa kišnicom, što dovodi do osmolize i pucanja polenskog zrna. U vodi rastvorni fenoli iz polena *A. artemisiifolia* su izolovani novom metodom ekstrakcije.

Prvi korak nove procedure zasnovane na vodenoj ekstrakciji je otklanjanje biološki aktivnih lipidnih molekula. Ukratko, 2g polena *A. artemisiifolia* L je odmašćeno tri puta sa 20mL heksana, nakon čega je polen osušen na sobnoj temperaturi. Dodato je 15 mL vode i smeša je mešana tokom 4 sata na 4°C. Nakon ovog koraka, smeša je centrifugirana 20 minuta na 3000g i dodato je 15mL heksana. Vodeni sloj je odvojen nakon 30 minuta i pomešan sa istom zapreminom etil-acetata. Smeša je ostavljena na 4°C tokom 10 sati. Etil acetatni sloj je odvojen i uparen do suva. Suvi ostatak je rastvoren u 1mL destilovane vode, i dobijeni rastvor je korišćen u daljim analizama. Sve ekstrakcije su radjene u triplikatu.

Subpolenske čestice su izolovane prema radu Bacsı et al.(Bacsı, Choudhury et al. 2006), uz manje modifikacije.

1g polena *A. artemisiifolia* L. je osmolizovan sa 10mL destilovane vode tokom 4 sata. Polenska zrna su otklonjena centrifugiranjem na 1500g tokom 15 minuta. Supernatant je nakon toga centrifugiran 30 minuta na 10.000g, i čvrsti ostatak prečišćenih subpolenskih čestica je osušen preko noći na sobnoj temperaturi.

Ekstrakcija fenola iz supolenskih čestica je sprovedena prema već opisanoj proceduri uz modifikacije. 35mg subpolenskih čestica je odmašćeno sa 3 x 1mL heksana, uz 15 minuta centrifugiranja na 10000g izmedju koraka. Nakon toga 950 $\mu$ L heksana je uklonjeno i ostatak odmašćenih subpolenskih čestica je osušen preko noći na sobnoj temperaturi. Fenolna jedinjenja su ekstrahovana sa 3 x 300 $\mu$ l etil-acetata. Etil-acetatne frakcije su spojene i uparene do suva u evaporatoru tokom 1h. Suvi ostatak je rastvaran u 1mL destilovane vode i korišćen u daljim analizama. Usled ograničene količine materijala, subpolenske čestice nisu dalje prečišćavane reverzno-faznim hromatografijom.

#### ***3.1.2.4 Etanolna ekstrakcija fenola iz polena i subpolenskih čestica A. artemisiifolia L.***

Količina fenola koji su dobijeni vodenom ekstrakcijom nije bila dovoljna za sve analize, zbog čega je razvijena i brza etanolna ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz odmašćenog polena i subpolenskih čestica. Fenoli iz polena i subpolenskih čestica su ekstrahovani 70% etanolom u zapreminskom odnosu 1:20, tokom 50 minuta na 50°C uz mešanje. Supernatant je odvojen i ekstrakcija je ponovljena pod istim uslovima. Nakon ovog koraka, odgovarajući ekstrakti su spojeni, upareni do suva i rastvoreni u destilovanoj vodi. Sve ekstrakcije su ponovljene u triplikatu.

#### ***3.1.2.5 Preparativna hromatografija***

Preparativna hromatografija je vršena kako bi se uklonili ostaci proteina i peptida, koji su potencijalno prisutni u uzorku, a mogu da interferiraju sa rezultatima imunoloških studija

Rastvorni fenoli polena su dalje prečišćavani reverzno-faznom hromatografijom na C18 koloni. Elucija je vršena linearnim gradijentom (A: 0.1% mravlja kiselina u vodi, B: 0.1% mravlja kiselina u 90% etanolu) uz protok od 1mL/min tokom 19 minuta. Korišćena je kolona Spherisorb ODS 2 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m (Waters, Milford, MA, USA) na Acta Purifier 10 sistemu sa UV detektorom (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Frakcije u kojima su detektovani fenoli (a na osnovu podataka o apsorpcionim maksimuma na  $\lambda = 215$  i  $\lambda = 260$  nm) su spojene i dalje analizirane.

### **3.1.2.6 Merenje ukupne koncentracije fenola**

Za merenje ukupne koncentracija fenola u vodenim i etanolnim ekstraktima polena i subpolenskih čestica korišćen je modifikovani protokol po Folin–Ciocalteu (Karhunen, Niku-Paavola et al. 1990), prilagodjen za merenje u mikrotitar pločama od 96 bunara.

Ukratko, 100  $\mu\text{L}$  10x razblaženog Follin-Ciocalteu reagensa je dodato u 10 $\mu\text{L}$  ekstrakata polena li subpolenskih čestica i inkubirano u mraku na sobnoj temperaturi tokom 5 minuta. Nakon toga, dodato je 140 $\mu\text{L}$  sveže pripremljenog 7.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i smeša je inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Merena je apsorbancija na 620nm. Sva merenja su vršena u triplicatu. Ukupni fenoli su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu polena, uz korišćenje galne kiseline kao standarda (raspon koncentracija : 0.01-0.5mg/mL).

### **3.1.2.7 Merenje koncentracije flavonoida**

Koncentracija flavonoida je određivana u etanolnim i vodenim ekstraktima polena i subpolenskih čestica, uz korišćenje modifikovanog protokola po Penarieti et al. (Penarieti, Alvarado et al. 2008). Ovaj metod se zasniva na nastanku obojenih kompleksa flavonoida i aluminijuma. Ukratko, u smešu koja sadrži 10  $\mu\text{L}$  10%  $\text{NaNO}_2$ , 20  $\mu\text{L}$  20%  $\text{AlCl}_3$ , 70  $\mu\text{L}$  1M  $\text{NaOH}$  i 100  $\mu\text{L}$  destilovane vode se dodaje 30 $\mu\text{L}$  uzorka i smeša se inkubira 5 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se meri apsorbancija na 405nm. Kao standard je korišćen kvercetin, uz kalibracionu pravu u opsegu 0.01-0.125 mg/mL. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata kvercetina/g uzorka. Sva merenja su vršena u triplicatu.

### **3.1.2.8 Antioksidativni esej sa 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH esej)**

Antioksidativna svojstva ekstrakata su određivana korišćenjem DPPH eseja.

Ukratko, 10 $\mu\text{L}$  uzorka je pomešano sa 190 $\mu\text{L}$  rastvora DPPH koncentracije  $6 \times 10^{-5}$  mol/L s i inkubirano 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga, merena je apsorbancija na 540nm i računata je scavenging aktivnost, uz korišćenje metanola kao slepe probe. Procenat inhibicije je izračunavan naspram kontrolnog rastvora koji je sadržao metanol umesto ispitivanog rastvora. (Kikuzaki, Hisamoto et al. 2002).

### **3.1.2.9 Antioksidativni esej sa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) katjonom (ABTS+ esej)**

Procedura je radjena po metodi Re et al (Re, Pellegrini et al. 1999), uz modifikacije. Po 10mL rastvora 7.4 mM ABTS+ solution i 2.-6mM kalijum persulfata su pomešani u jednakim koncentracijama i inkubirani tokom 12 sati na sobnoj temperaturi u mraku. Rastvor je nakon toga razblaživan do 60mL ukupne zapremine, kako bi se dobio finalni reagens sa apsorbancijom



0.7 na talasnoj dužini od 734 nm. Svež rastvor ABTS+ jona je pripreman pre svake analize. Esej je izvodjen mešanjem 20 $\mu$ L ekstrakata polena sa 180 $\mu$ L rastvora ABTS+ jona tokom 2h u mraku, nakon čega je merena apsorbance na 734nm.

Procenat inhibicije apsorbance na 734nm je računat kao funkcija koncentracije fenola iz polena naspram podataka dobijenih merenjem antioksidativnih aktivnosti standarda kvercetina, u rasponu koncentracija 0.01-0.5 mg/mL. Inhibicija je izražavana kao koncentracioni ekvivalent standardnog antioksidanta.

#### ***3.1.2.10 UHPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS-MS analiza***

Vodeni ekstrakti fenola polena i subpolenskih čestica su analizirani Accela UHPLC aparatom sa Orbitrap-linearna jonska zampa (LTQ) XL masenim spektrometrom (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Razdvajanje je postignuto Hypersyl Gold reverzno faznom kolonom visoke rezolucije (50 mm  $\times$  2.3 mm 1.8  $\mu$ m Hypersil Gold rapid resolution reverse-phase column, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Binarna mobilna faza se sastojala od 0.1% mravlje kiseline u vodi (A) i 0.1% mravlje kiseline u 98% acetonitrilu(B), uz protok od 0.3mL/min. Komponente su eluirane linearnim gradijentom 5-95% B tokom 9 minuta. Injektovano je 1 $\mu$ L uzorka po analizi.

Za analizu je korišćen grejani ESI izvor (HESI) podešen na 350°C, uz temperaturu kapilare podešenu na 275°C. Rezolucija Orbitrap detektora je podešena na 30.000, uz automatsku kontrolu intenziteta jonskog signala podešenu na  $1 \times 10^6$  jona. Za kontrolu instrumenta, akviziciju podataka i analizu korišćeni su softverski paketi Xcalibur 2.1 i MassFrontier 6.0.

#### ***3.1.2.11 Statistička analiza***

Rezultati su izražavani (svuda gde je primenljivo) u obliku **srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija**. Kalibracione prave su konstruisane linearnom regresijom vrednosti aposorbance rastvora standarda različitih koncentracija. Za statističke analize je korišćen programski paket Graph Pad Prism 6.0, uključujući dvostrani t-test za poredjenje dve grupe, ili nesparena jednostrana ANOVA pri poredjenju tri ili više eksperimentalne grupe. Razlike su smatrane statistički značajnim pri vrednosti  $p < 0.05$ .

### 3.1.3 Rezultati i diskusija

#### 3.1.3.1 Koncentracija fenola i flavonoida u ekstraktima polena i subpolenskih čestica *A. artemisiifolia* L.

Utvrđeno je da etanolni ekstrakt *Ambrosia artemisiifolia* L. polena sadrži fenolna jedinjenja u koncentraciji od  $6.79 \pm 0.05$  mg GAE/g polena, dok ista vrednost za subpolenske čestice iznosi  $4.56 \pm 0.06$  mg GAE/g subpolenskih čestica, što je za 33% manja vrednost. Pored toga, ustanovljeno je da flavonoidi čine do 98% od ukupnih fenolnih jedinjenja u subpolenskim česticama ( $4.45 \pm 0.01$  mg/g), kao i oko 70% od ukupnih fenola za ekstrakt polena ( $4.71 \pm 0.04$  mg/g).

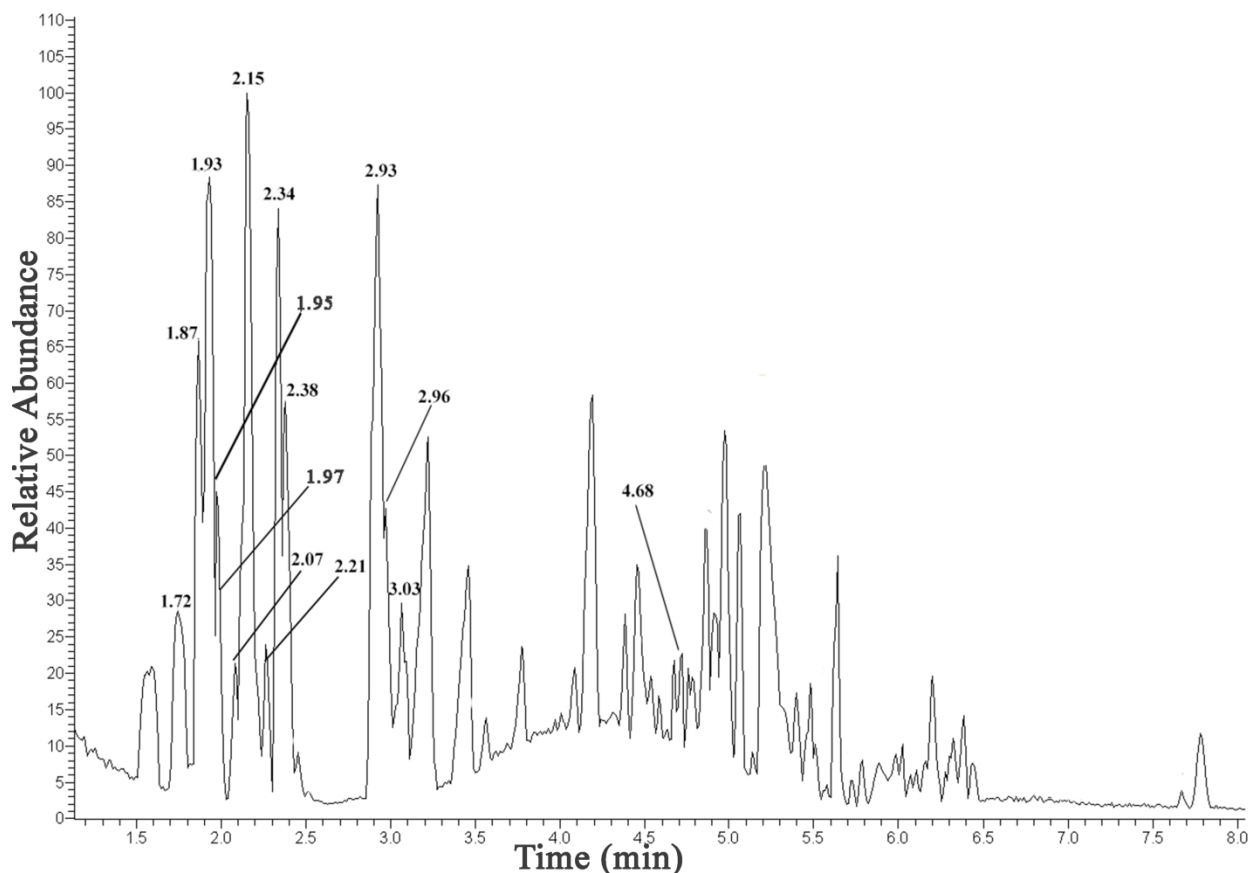
Vodeni ekstrakt polena sadrži  $4.51 \pm 0.02$  mg GAE/g polena. Ova vrednost koncentracije je značajno niža od koncentracija koje se mogu naći u literaturi, koje mogu iznositi čak i do 4.35% totalne suve težine biljke ( $43.5$  mg/g suve biljke) (Maksimović 2008). Objašnjenje ovog rezultata treba potražiti u različitim biološkim ulogama koje fenoli mogu igrati u polenu naspram listova i stabljika (Falasca, Franceschetti et al. 2010). Flavonoidi su u vodenom ekstraktu polena prisutni u koncentraciji od  $3.95 \pm 0.24$  mg/g polena, što čini 87.5% od ukupnih rastvornih fenola polena. Može se zaključiti da su flavonoidi glavna fenolna komponenta polena i subpolenskih čestica, za razliku od cvetnih pupoljaka suve biljke, gde ova jedinjenja čine manje od 5% od ukupnih fenola. (Maksimović 2008). Vrednosti koncentracija dobijenih za vodene i etanolne ekstrakte polena *A. artemisiifolia* L. su takodje niži od vrednosti koje su dobijene za polene koje su skupljale pčele. U literaturi nema podataka o fenolnom sadržaju subpolenskih čestica,. Može se uočiti da subpolenske čestice imaju za trećinu niži sadržaj ukupnih fenola od ekstrakta polena, što može biti od značaja pri diskusiji svojstava fenola koja su vezana za modulaciju razvoja alergija. Poznato je pored direktnih anti-alergijskih efekata (Yoon, Lee et al. 2006), polifenolna jedinjenja mogu da ublaže simptome alergije reakcijom sa alergenima i sledstvenim smanjenjem njihove alergenosti (Javanmardi, Khalighi et al. 2002; Martinez-Sanchez, Gil-Izquierdo et al. 2008).

#### 3.1.3.2 Karakterizacija u vodi rastvornih fenola polena *A. artemisiifolia* L. masenom spektrometrijom visoke rezolucije

Analiza rezultata masene spektrometrije je pokazala da fenoli polena *A. artemisiifolia* L. imaju kompleksan i raznolik sastav, koji uključuje i fenolne derivate poliamida spermidina. Svi fenolni glikozidi detektovani UHPLC/ESI-LTQ-MS/MS Orbitrap uređajem su prikazani u tabeli 1. Hromatogram je prikazan na Slici 1.

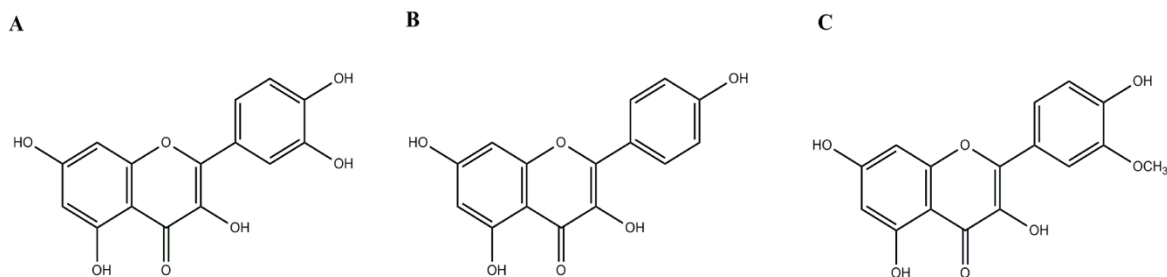
Retenciono vreme	m/z	m/z fragmenata			Molekulska formula	Ime jedinjenja
0.38	179.0566	135.03		59.01	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	kafeična kiselina
0.49	191.0202				C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	kininska kiselina
4.68	353.2009	309.25	295.09	262.48	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> O <sub>6</sub>	kafeoilkininska kiselina
1.72	449.1208	285.07	256.08		C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	kampferol heksozid
3.94	462.9642	301.06			C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	kvercetine heksozid
2.09	463.0891	301.04	179.01		C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	kvercetin heksozid
2.25	477.1049	357.09	314.03	285.10	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	ramnetine heksozid
2.21	505.0999	463.10	445.06	300.09	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>13</sub>	ramnetin methil heksuronid
2.38	519.1200	487.14	403.11		C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>13</sub>	ramnetin acetilheksozid
2.31	533.0952	489.15	428.89	285.05	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> O <sub>14</sub>	kampferol malonil heksozid
2.15	549.0897	505.13	491.37	300.87	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> O <sub>15</sub>	kvercetin malonil glucozid
2.38	563.1055	519.03	487.15	403.11	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>15</sub>	ramnetin malonilheksozid
2.09	593.1500	413.17	315.07	241.09	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	kampferol rutinozid
2.96	582.2619	462.22	436.17	342.16	C <sub>34</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	Tri-p-kumaroil spermidin
2.93	598.2566	478.20	436.17	358.19	C <sub>34</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Di kumaril-kafeoil spermidin
1.89	609.1472	445.16	315.10	300.05	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub>	izomer ramnetin diheksozida
1.97	609.1475	445.16	315.10	300.05	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub>	izomer ramnetin diheksozida
1.87	625.1419	463.07	301.07	315.13	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>15</sub>	izomer ramnetin rutinozida
5.07	625.3458	579.17	340.93		C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>15</sub>	izomer ramnetin rutinozida
1.91	639.1578	477.16	315.11	300.08	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> O <sub>15</sub>	izomer ramnetin diramnosiil-heksozida
3.03	785.3573	315.20			C <sub>36</sub> H <sub>47</sub> O <sub>19</sub>	ramnetin ramnozil diheksozid
4.12	162.9829	119.05	93.03		C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	p-kumarinska kiselina

Tabela 1-jedinjenja detektovana u ekstraktu polena *A. artemisiifolia*



**Slika 1. Bazni hromatogram ekstrakta polena *E. artemisiifolia* analiziranog na UHPLC/ESI LTQ-Orbitrap masenom spektrometru.**

Svi detektovani glikozidi su derivati nekoliko glavnih flavonola - kvercetina, O-metilqvercetina, izoramnetina i kampferola (Slika 2. Glavni aglikoni detektovani u vodenom ekstraktu polena *A. artemisiifolia*. A – kvercetin, B-. Za svaki aglikon je detektovana serija satelitskih pikova, koji predstavljaju nesupstituisane i malonilovane heksozide i heksuronide.

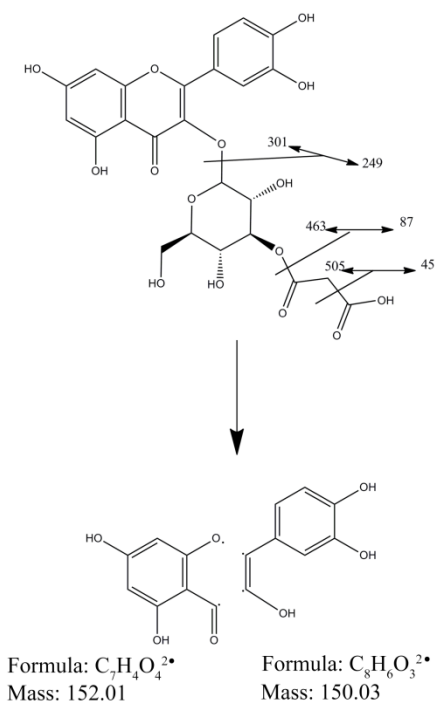


**Slika 2.** Glavni aglikoni detektovani u vodenom ekstraktu polena *A. artemisiifolia*. A – kvercetin, B-kampferol, C –isoramnetin

Analiza fragmenata je omogućila identifikaciju  $[Y_0-2H-CO]^-$  jona, koji su karakteristični za 3-O-monoglikozide, što potvrđuje strukture pretpostavljene iz preliminarnih rezultata (Vukics and Guttman 2010).

Pored aglikonskog ( $Y_0^-$ ) fragmenta, uočen je i vrlo prisutan radikal aglikona  $[Y_0-H]^\bullet$ , što ukazuje na gubitak 3-O-glukozil fragmenta. Na  $MS^2$  spektrima je moguće uočiti je da cela serija aglikonskih jona ( $m/z$  285, 301, 315) praćena jonima sa  $m/z$  vrednostima 284, 300, 314, što dalje dokazuje da su 3-O-glikozidi dominantni derivati fenola prisutni u smeši.

Fragmentacija derivata kvercetina (kvercetin-3-glukozid-3-malonata) je prikazana na Slika 3.



**Slika 3.** Šema fragmentacije 3-O(3-O-malonyl) kvercetina

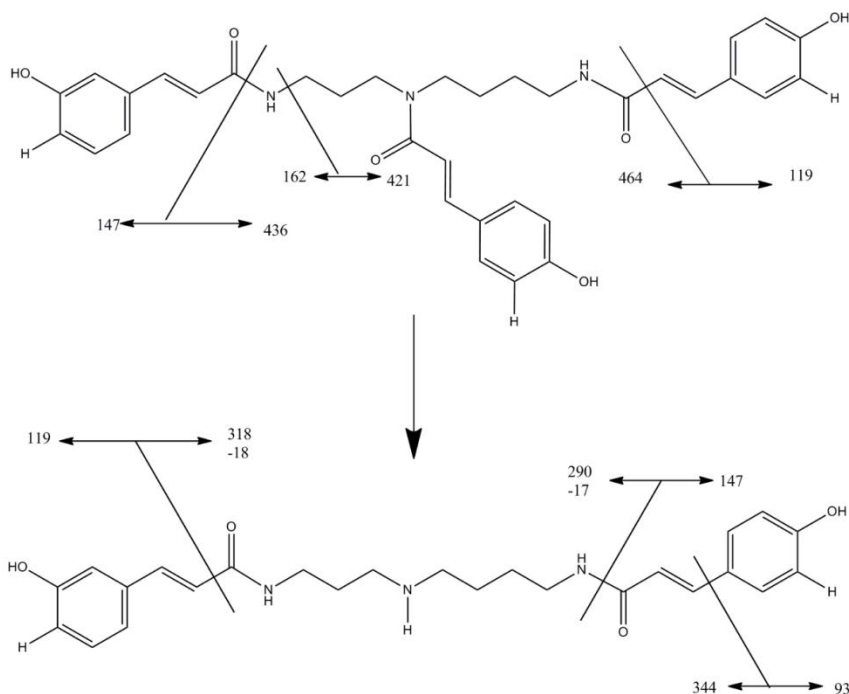
Odnos količina aglikona radikala i uobičajenog aglikonskog jona zavisi od fragmentacije 3-O glikozidne veze i raste sa porastom supstitucije –OH grupa oko B-prstena flavonoidnog jezgra, dok 7-O glikozidi pokazuju upravo suprotno ponašanje. (March, Lewars et al. 2006). Ovaj fenomen se može uočiti pri poredjenju pikova derivata kampferola i kvercetina (pikovi na RT 1.72 i 2.09, kao i 1.89 i 2.09). Identitet aglikona je potvrđen praćenjem  $^{1,3}B_0$  and  $^{1,3}A_0$  fragmenata na MS<sup>2</sup> spektru. I kvercetin i izoramnetin fragmentacijom mogu da daju  $^{1,3}A_0$  fragment sa m/z of 151 u negativnom modu snimanja, do čega dolazi kroz reakciju koja uključuje retro Diels-Alder mehanizam.

Jedinjenja koja sadrže metoksi-supstituent pokazuju slabiju retro Diels-Alder fragmentaciju u poredjenju sa fragmentacionim spektrima derivata kvercetina i izoramnetina. (RT 2.2 i 2.21, 1.72 i 1.93) (Fabre, Rustan et al. 2001).

### 3.1.3.3 Derivati spermidina u ekstraktu polena *A. artemisiifolia* L.

Fenolamidi su velika i raznovrsna grupa sekundarnih metabolita koja nastaje konjugacijom fenolnih jedinjenja sa poliamidima, poput spermidina (Bassard, Ullmann et al. 2010). U ekstraktu polena *A. artemisiifolia* L je detektovano nekoliko derivata spermidina. Među njima, najprominentniji su di-kumaril-kafoil i tri-kumaril derivati.

Slika 4. prikazuje fragmentaciju derivata spermidina.



**Slika 4. Fragmentaciona šema za derivate spermidina identifikovanih u vodenom ekstraktu polena ambrozije**

Utvrđeno je da pik sa retencionim vremenom 2.93 i m/z  $[M - H]^-$  jona od 598.2573 pokazuje karakterističnu fragmentacionu šemu (Sobolev, Sy et al. 2008), sa fragmentima m/z 478, što se može pripisati gubitku fragmenta p-kumarinske kiseline ( $[M - H]^- - HO-C_6-H_4-CH=CH$ ), m/z 436 (gubitak kumaroil ostatka) and m/z 358 (gubitak fragmenta od 120Da na N<sup>5</sup> i raskidanje C-C veze kafeoil ostatka vezanog na N<sup>10</sup>). Jedinjenje je identifikovano kao di-kumaroil-kafoil spermidin.

Slično, pik sa m/z od 582.262 uočen na retencionom vremenu 2.96 daje seriju fragmenata u MS<sup>2</sup>spektrima sa m/z 462, 436 i 358, prema identičnom fragmentacionom mehanizmu, i uz razliku od 16 Da za fragmente m/z 462 i 436. Razlika potiče od zamene kafeoil ostatka kumaril ostatkom. Jedinjenje je identifikovano kao tri-kumaril spermidin. Opažene mase se mogu objasniti nastankom homolitičkom raskida veza i deprotonovanjem proizvoda tokom fragmentacije, što nije opisano u do sada objavljenoj literaturi koja se bavi fragmentacijom poliamidnih fenola (Larbat, Olsen et al. 2012).

Spermidin i druga poliamidna jedinjenja su široko rasprostranjeni u svim organizmima i poznato je da su od važnosti u mnogim fiziološkim procesima. (Falasca, Franceschetti et al. 2010); (Igarashi and Kashiwagi 2010). Pokazano je da ova jedinjenja funkcionišu kao prirodni hvatači slobodnih radikala (Ha, Yager et al. 1998). Spermidin acil derivati su ranije opisani u polenu (Bassard, Ullmann et al. 2010; Kite, Larsson et al. 2013). Autori zaključuju da su di- i tri-supstituisani hidroksicinamoil konjugati spermidina i putrescina glavni metaboliti polena i predložio da ova jedinjenja imaju ulogu u odbrani od virusa, bakterija i gljiva. Konjugati spermidina se povezuju i sa detoksikacijom fenolnih jedinjenja, i funkcijom depoa poliamina za aktivno proliferišuća tkiva. Pored toga poliamidi i njihovi derivati imaju regulatornu ulogu u nekoliko imunoloških procesa, uključujući alergijske reakcije (Bueb, Mousli et al. 1991; Hoet and Nemery 2000), regulaciju funkcije T-ćelija, ćelijsku migraciju i rast pri lokalnim zapaljenjskim procesima (Ferioli, Pirona et al. 2000).

**3.1.3.4 Karakterizacija fenolnog ekstrakta subpolenskih čestica *A. artemissifolia* L.**

Fenolni sastav polena i subpolenskih čestica do sada nisu poredjeni ni za jednu biljnu vrstu. Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio i istovremena karakterizacija ekstrakta, jer je prethodno pokazano da fenolna jedinjenja poseduju imunomodulatorne efekte (González Romano, Gallego et al. 1996; Hoet and Nemery 2000; Koistinen, Soininen et al. 2005), kao i da subpolenske čestice imaju izražene efekte na razvoj ozbiljnih alergijskih simptoma (Bacsi,

Choudhury et al. 2006). UHPLC/ESI-MS-MS analiza fenolnog sasatava subpolenskih čestica je izvršena na Orbitrap instrumentu, uz korišćenje iste metode kao pri analizi sastava fenola celog polena. Rezultati pokazuju da su i u ovom slučaju flavonoidni O-glikozidi glavne komponente fenolne frakcije subpolenskih čestica *A. artemisiifolia* L. (Tabela 2).

Retenciono vreme (min)	m/z	Dijagnostički fragment			Molekulska formula	Ime jedinjenja
1.87	625.142	463.06	301.07	151.02	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>17</sub>	Kvercetin diglukozid
2.08	595.137	463.07	301.06	255.0151	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	Kvercetin-3-O-glucosil-6-O-pentozid
2.18	490.981	301.04	179.1	151.03	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	Kvercetin O-metil heksuronid
2.21	505.100	461.1	315.04	151.06	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	Ramnetin O-metil heksuronid
2.29	477.110	357.08	314.03	285.08	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	Ramnetin 3-O- glukoizid
2.34	533.095	489.15	428.89	285.05	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	Kaempferol O-malonil-acetil glukoizid
2.37	519.120	487.11	403.11	315.03	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	Izoramnetin O-acetil glukoizid
2.43	563.106	519.02	487.13	403.11	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>15</sub>	izoramnetin O-malonil glukoizid
2.94	598.257	478.2	436.17	358.19	C <sub>34</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	di-koumaroil kafeoil spermidin
2.87	582.265	462.22	436.19	342.18	C <sub>34</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	tri-p-koumaroil spermidin
3.03	787.359	477.20	374.06	315.2	C <sub>36</sub> H <sub>47</sub> O <sub>19</sub>	Izoramnetin rutinozil-glukoizid

**Tabela 2. Jedinjenja detektovana u ekstraktu subpolenskih čestica *A. artemisiifolia***

Pri poredjenju sa fenolima ukupnog polena, subpolenske čestice pokazuju sličan sastav, ali manju količinu fenola, kao i manji broj različitih malih fenolnih jedinjenja (mase ispod 450Da).

Glavne komponente su monoglikozidni derivati izoramnetina i kvercetina, koji daju karakteristične fragmentacione spektre (<sup>1,3</sup>A<sub>0</sub> and <sup>1,3</sup>B<sub>0</sub> fragmenti)(Tabela 2). Diglikozidi izoramnetina nisu detektovani u ekstraktu polena. Prisutni su i derivati spermidina, što ostavlja prostora za diskusiju o eventualnim imunomodulatornim efektima do kojih bi mogli dovesti.

### 3.1.3.5 Antioksidativne osobine ekstrakta polena i subpolenskih čestica *A. artemisiifolia*

DPPH esej često koristi kako bi se utvrdila sposobnost jedinjenja ili smeše da neutrališe slobodne radikale. Ekstrakt polena ambrozije koncentracije 1 mg/L pokazuje 73±2%



neutralizacije slobodnih radikala, u poredjenju sa slepom probom (metanol). Ova vrednost je ekvivalentna aktivnosti neutralizacije slobodnih radikala od 28.4  $\mu\text{M}$  butiliranog hidroksil-toluena(BHT). Ekstrakt subpolenskih čestica iste koncentracije fenola pokazuje niže vrednosti sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala( $56\pm 2\%$ ), što je smanjenje od 23%. Rezultati pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ). Za oba ekstrakta se može tvrditi da poseduju antioksidativnu aktivnost, što potvrđuju i drugi autori (Negri, Teixeira et al. 2011).

ABTS+ esej je korišćen za merenje antioksidativne sposobnosti ekstrakta

Ekstrakt polena je pokazao aktivnost ekvivalentnu 5.9+0.2  $\mu\text{M}$  kvercetina, dok je aktivnost ekstrakta subpolenskih čestica značajno niža ( $p < 0.001$ ) i iznosi 4.1+0.1  $\mu\text{M}$  ekvivalenta kvercetina (umanjenje za 31%). Obe vrednosti su niže od vrednosti očekivanih na osnovu koncentracije fenola. Iako je kvercentin(korišćen kao standard) strukturno sličan glavnim sastojcima smeše, većina fenola koji su prisutni u smeši su glikozilovani ili drugačije modifikovani. što može da utiče na oksidativni kapacitet smeše.

## **3.2 Fenolni sastav lakazom tretiranog ekstrakta kikirikija**

### **3.2.1 Uvod**

Kikiriki je jako rasprostranjena namirnica koja je i izvor veoma značajnih alergena. Prevalencija alergija na kikiriki je oko 8%, a kod odraslih 1-2%, ali su simptomi veoma ozbiljni i mogu da imaju i fatalni ishod. Alergeni sastav ekstrakta kikirikija je veoma dobro proučen(Al-Ahmed, Alsowaidi et al. 2008), kao i sastav polifenola poreklom uglavnom iz ljuske kikirikija(Sobolev, Horn et al. 2006; Ma, Kosinska-Cagnazzo et al. 2014). Uticaj fenolnih molekula na razvoj i progresiju imunoloških oboljenja je predmet intenzivnih ispitivanja(Zhu, Li et al. 2013; McCarthy, O'Callaghan et al. 2014).Do sada nema podataka o efektima koji enzimi poput fenol oksidaze mogu ostvariti na fenole u kompleksnim smešama kao što je vodeni ekstrakt kikirikija. Lakaza je enzim široke supstratnu specifičnosti koji potencijalno može da katalizuje reakcije oksidacije fenola u smeši i njihove sledstvene polimerizacije.

### **3.2.2 Materijal i metode**

#### ***3.2.2.1 Identifikacija fenolnih jedinjenja ekstrakta kikirikija i lakazom-tretiranog ekstrakta kikirikija***

Fenolna jedinjenja su ekstrahovana iz liofilizovanog netretiranog i lakazom-tretiranog ekstrakta kikirikija. 20mg liofilizata je ekstrahovano 2x sa 0.5mL 80% etanola (Mihajlovic, Radosavljevic et al. 2015). Etanolni ekstrakti su spajani i analizirani LC/MS.

Razdvajanje je vršeno na sistemu za tečnu hromatografiju koji se sastojao od kvaternarne pumpe Accela 600 i Accela autosamplera, koji su bili spojeni na linearnu jonsku zamku-Orbitrap hibridni maseni spektrometar (LTQ Orbitrap XL) sa grejanjem probe za elektrosprej jonizaciju HESI-II (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany).

Za identifikaciju i kvantifikaciju je korišćena analitička kolina Synchronis C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm veličina čestice) Mobilna faza se sastojala od (A) vode sa 0.01% sirćetne kiseline i (B) acetonitrila. Korišćen je sledeći kompozitni linearni gradijent sa protokom od 0.25mL/min: 0.0–1.0 min 2% B, 1.0–14.0 min od 2% to 98% (B), 14.0–14.1 min od 98 % do 2 % (B), zatim 2 % (B) tokom 5 min. Injekciona zapremina je bila 5μL. Maseni spektrometar je korišćen u negativnom modu. Korišćeni su sledeći parametri jonskog izvora: voltaža probe 4.5 kV, voltaža kapilare –4 V, voltaža cevastog sočiva – 59.11 V, temperatura kapilare 275 °C. Protok gasa omotača i pomoćnog gasa su iznosili 30, odnosno 7 (arbitrarnih jedinica). Spektri su snimani u rasponu m/z vrednosti od 120-1000. Fragmentacioni (MS<sup>2</sup>) spektri su snimani uz korišćene disocijacije indukovane sudarima (CID) u modu snimanja zavisnom od MS1 podataka (data-dependant scan). Normalizovana koliziona energija CID je postavljena na 35%.

Za kontrolu instrumenta, akviziciju i analizu podataka korišćen je softverski paket XCalibur (verzija 2.1). Fenoli su identifikovani na osnovu odgovarajućih spektralnih karakteristika: maseni spektar, tačna masa, karakteristike fragmentacije i retencionna vremena. Podaci su provereni poredjenjem sa podacima drugih autora (Sobolev and Cole 1999; Sobolev, Deyrup et al. 2006; Appeldoorn, Vincken et al. 2009).

Kvantifikacija odabranih jedinjenja je sprovedena na osnovu merenja egzaktne mase (±5ppm) pordjenjem sa retencionim vremenima i tačnim masama raspoloživih standarda. Ukupna količina svakog jedinjenja je procenjena izračunavanjem površine ispod pika (Xcalibur) i izražen u mg/kg.

### *3.2.2.2 Priprema standardnih rastvora fenolnih kiselina*

Svi stokovi fenolnih standarda su pripremani u metanolu i razblaživani do radnih koncentracija od 0.025, 0.050, 0.100, 0.250, 0.500, 0.750, and 1.000 mg/L. Kalibracione krive su dobijene iz zavisnosti površine ispod pika i poznate koncentracije. Postignuta je

visoka linearnost, sa  $R^2$  vrednostima preko 0.99 (zavisnost površine ispod pika od koncentracije).

### 3.2.3 Rezultati I diskusija

Ekstrakt kikirikija je veoma bogat polifenolnim jedinjenjima. Sadržaj fenola, izražen kao ekvivalenti galne kiseline, iznosio je  $1.0 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$  u ekstraktima kikirikija u kojima je koncentracija proteina kikirikija bila 5 mg/L. HPLC-MS/MS analiza fenolnih jedinjenja ekstrakta kikirikija je pokazala prisustvo procijanidina a i b i ostalih flavonoidnih jedinjenja, kao i fenolnih kiselina (Slika 5, Tabela 3).

m/z	Retenciono vreme (min)	Identifikovano jedinjenje	Relativne količine fenolnih jedinjenja (%)
137.04	0.95	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1.32
153.02	1.47	Protokatehuinska kiselina	ND
163.04	1.35	<i>p</i> -kumarinska kiselina	1.92
167.07	1.44	Vanilinska kiselina	9.01
169.04	0.95	Galna kiselina	ND
193.08	1.22	Ferulna kiselina	5.08
179.06	1.26	Kafeinska kiselina	0-7.11
187.1	4.71	Derivat kumarina	0.612
289.08	5.17	Katehin/epikatehin izomeri	0.17
293.11	5.34	Katehin/epikatehin izomeri	1.21
295.02	3.13	Katehin/epikatehin izomeri	ND
329.23	7.59	Izoramnetin -3-metoksi derivate	0.72
329.23	7.32	isorhamnetin-3-metoksi derivat	ND
353.2	2.21	Hlorogena kiselina	ND
457.08	4.10	Epigalokatehin galat	ND
441.08	4.37	Izomeri epikatehin galata	ND
441.08	4.45	Izomeri epikatehin galata	ND
441.08	4.91	Izomeri epikatehin galata	ND
441.08	5.12	Izomeri epikatehin galata	ND
477.16	6.18	Derivate izoramnetin –glukozida	5.17
575.2	6.09	Procijanidinski dimer a-tipa	0.06
575.2	6.18	Procijanidinski dimer a-tipa	0.08
579.17	7.09	Procijanidinski dimer b-tipa	0.512
579.17	7.15	Procijanidinski dimer b-tipa	ND
587.23	8.32	Flavonoidni derivate	0.13
619.24	4.10	Eigalokatehin galat glukozid	ND

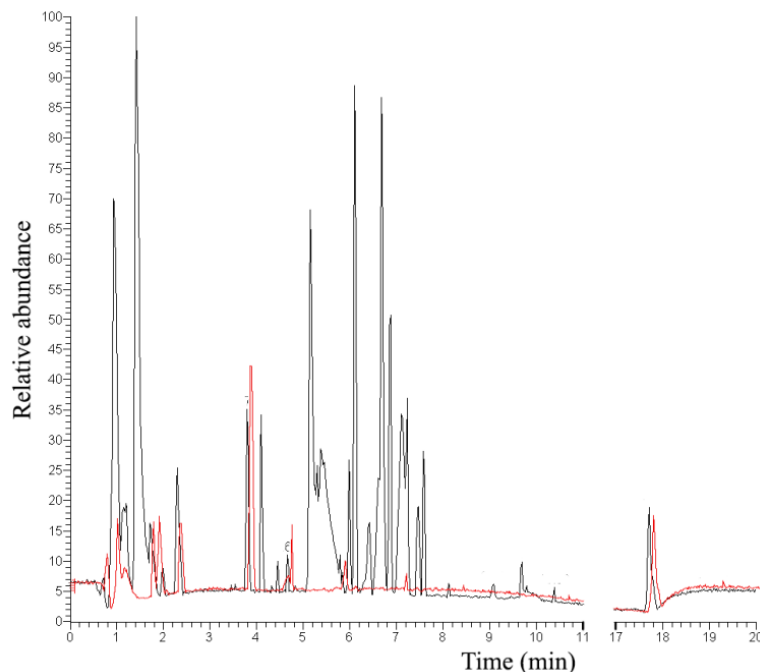
**Tabela 3. Relativne količine fenolnih jedinjenja identifikovanih u ekstraktu kikirikija tretiranom lakazom, u poređenju sa netretiranim ekstraktom kikirikija koje su uzimane kao 100 %. ND – nije detektovano.**

Nakon enzimske reakcije, HPLC-MS/MS analiza je pokazala da su relativne količine fenolnih jedinjenja značajno smanjena. U ekstraktu kikirikija tretiranom lakazom može se primetiti prisustvo derivata izoramnetina i procijanidinski dimer b-tipa, uz dodatne pikove koji potiču od neidentifikovanih jedinjenja.

Fenolno jedinjenje	Koncentracija fenola +SD(mg/kg)			
	Ekstrakt kikirikija		Lakazom tretirani ekstrakt kikirikija	
galna kiselina	50.38	<b>1.24</b>	ND	/
vanilinska kiselina	115.05	<b>5.71</b>	10.37	<b>0.56</b>
ferulna kiselina	99.83	<b>0.38</b>	5.08	<b>0.43</b>
<i>p</i> -kumarinska kiselina	5552.90	<b>89.47</b>	106.76	<b>4.69</b>

**Tabela 4. Koncentracije izabranih fenolnih kiselina u ekstraktu kikirikija**

Većina fenolnih jedinjenja, kao što su izomeri katehina/epikatehina, epikatehin galat i procijanidinski dimer b-tipa, nisu detektovani u enzimski tretiranom uzorku (Tabela 3). Koncentracije selektovanih jedinjenja (galna kiselina, vanilinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulna kiselina) su bile više od 10 puta više u netretiranom, u odnosu na lakazno tretirane uzorke (Tabela 4).



**Slika 5. UHPLC hromatogram polifenola kikirikija (crna linija) i polifenola kikirikija tretiranih lakazom (crvena linija). Razlika u zastupljenosti fenola je jasno vidljiva. Eksperiment je urađen u triplikatu.**

Rezultati dobijeni nakon hromatografskog razdvajanja i detekcije masenom spektrometrijom ekstrakta kikirikija pre i nakon tretmana lakazom pokazuju da su relativne količine fenolnih jedinjenja značajno smanjene usled polimerizacije katalizovane ovom polifenol oksidazom. Mada je nakon enzimskog tretmana količina fenolnih kiselina manje opala u odnosu na druge bitne klase fenolnih jedinjenja (npr. katehin i derivati) i njihova količina je dramatično smanjena.

### 3.3 Fenolni sastav zelenog čaja

#### 3.3.1 Uvod

Zeleni čaj predstavlja lišće biljke zelenog čaja *Camelia sinensis*, koje se koristi za spremanje napitaka od 4000 pne.

Zeleni čaj je naročito bogat izvor katehina, polihidroksi flavan-3-ol derivata, uglavnom (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epikatehin-O-galata i (-)-epigalokatehina (Chen, Zhao et al. 2009). Zahvaljujući svom polifenolnom sastavu, zeleni čaj poseduje izuzetnu antioksidativnu aktivnost, a brojne studije su pokazale brojne pogodnosti po zdravlje koje redovna upotreba ove namirnice donosi. (Shahidi and Zhong 2008; Shahidi and Zhong 2011)

### 3.3.2 Materijal i metode

#### 3.3.2.1 Priprema ekstrakta zelenog čaja

Fenoli iz biljke zelenog čaja (*Camellia sinensis*) su izolovani iz dva izvora – komercijalnog suplementa biljnog ekstrakta u formi kapsula (Zeleni čaj – Nutricel, “Pharmanova“, Obrenovac, Serbia), kao i osušenog lišća zelenog čaja (poreklom iz Kine, rastresit list)

Sadržaj kapsula zelenog čaja (250 mg) je ratvoren u 5 ml dejonizovane vode. Nakon 20 minuta mešanja rastvor je centrifugiran tokom 15 minuta na 12000 g. Supernatant je pažljivo prenešen u novu kivetu i zamrznut (-20 C) do dalje upotrebe.

Lišće zelenog čaja (5 g) je homogenizovano u avanu sa tučkom uz dodatak tečnog azota. Homogenat je prebačen u 100 ml ključale vode i ostavljen da se kuva 10 minuta, nakon čega je suspenzija ostavljena da se ohladi do sobne temperature. U ohlađenu smešu je dodato 40 ml metanola i smeša je mučkana na mešalici tokom 1 h. Nakon toga smeša je filtrirana kako bi se uklonile krupne čestice. Filtrat je prebačen u kivete i centrifugiran tokom 30 min na 12000g. Supernatant je pažljivo prebačen u novu kivetu i zamrznut do dalje upotrebe.

Ukupni fenoli ekstrakata zelenog čaja su određivani spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu-ovog reagensa (Merck, Darmstadt, Germany)(Ainsworth and Gillespie 2007) i izražavani su kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L ekstrakta.

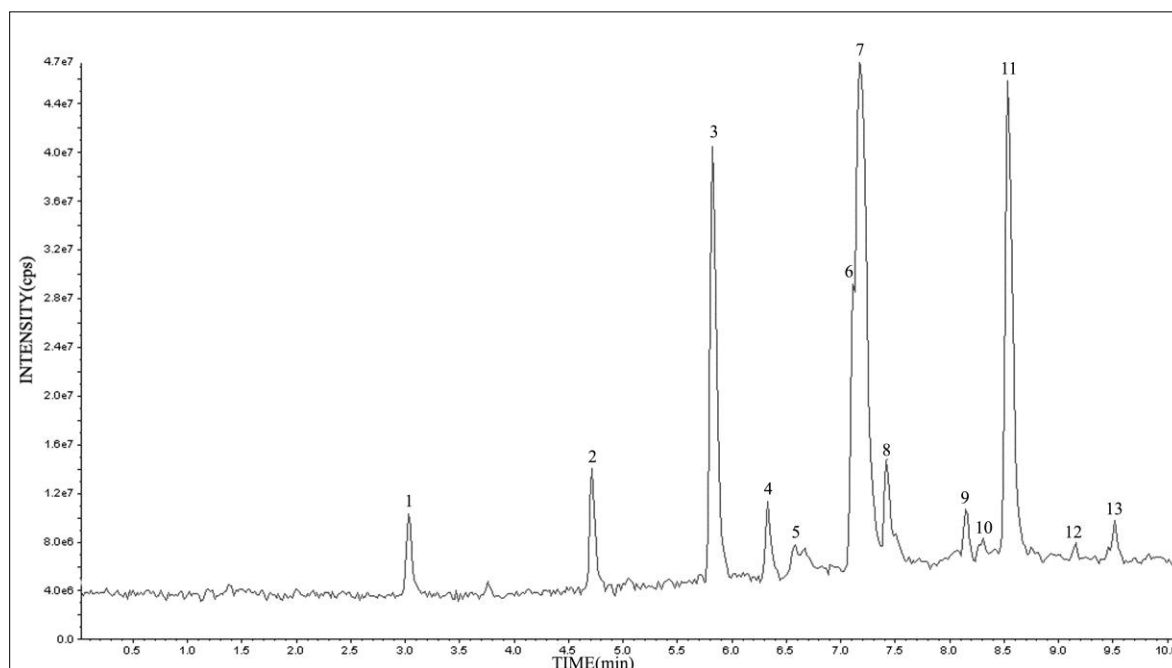
#### 3.3.2.2 LC/MS analiza ekstrakta zelenog čaja

Hromatografsko razdvajanje ekstrakata zelenog čaja je izvodjeno na HPLC-ESI/MS-TOF aparatu Agilent 1100, koji poseduje DAD detektor (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Razdvajanje je vršeno na koloni Zorbax C18 1.7 $\mu$ m (4.6x50mm) (Agilent Technologies).. Mobilna faza se sastojala od 0.1% mravlje kiseline u vodi (A) i 0.1% mravlje kiseline u 90% acetnitrilu (B). Razdvajanje je vršeno linearnim gradijentom 0-90%B tokom 20 minuta. Injekciona zapremina svih uzoraka je bila 1 $\mu$ L. Masena detekcija je vršena Agilent 6520 TOF detektorom (G1969A, Agilent Technologies) koji je kuplovan sa hromatografskim sistemom. Maseni spektri su snimani sa rasponom m/z od 100 do 3200. Korišćeni su sledeći parametri: voltaža proboja, 2000V; voltaža kapilare, 4000V; pritisak nebulizatora, 45 psig; protok gasa za sušenje, 12L/min.

Uzorci su snimani u negativnom režimu. Podaci su obradivani softverskim paketom Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), kao i Chemspider bazom podataka za strukturne pretrage (Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK). Komponente čajnih ekstrakata su identifikovane prema m/z vrednostima, UV/Vis apsorpcionim spektrima (Chandrasekara and Shahidi 2011) i retencionim vremenima. Zbog razlika u načinu razdvajanja i modernoj tehnologiji kolona, vrednosti retencionih vremena su skraćene u odnosu na vrednosti koje se mogu naći u literaturi. Koncentracija fenola je kvantifikovana merenjem površine ispod pikova hromatograma.

### 3.3.3 Rezultati i diskusija

Tabela 5 i Slika 6 prikazuju rezultate dobijene nakon hromatografskog razdvajanja i masene detekcije ekstrakta zelenog čaja iz kapsula



**Slika 6. LC-MS fenola ekstrakta zelenog čaja iz komercijalnog suplementa.**

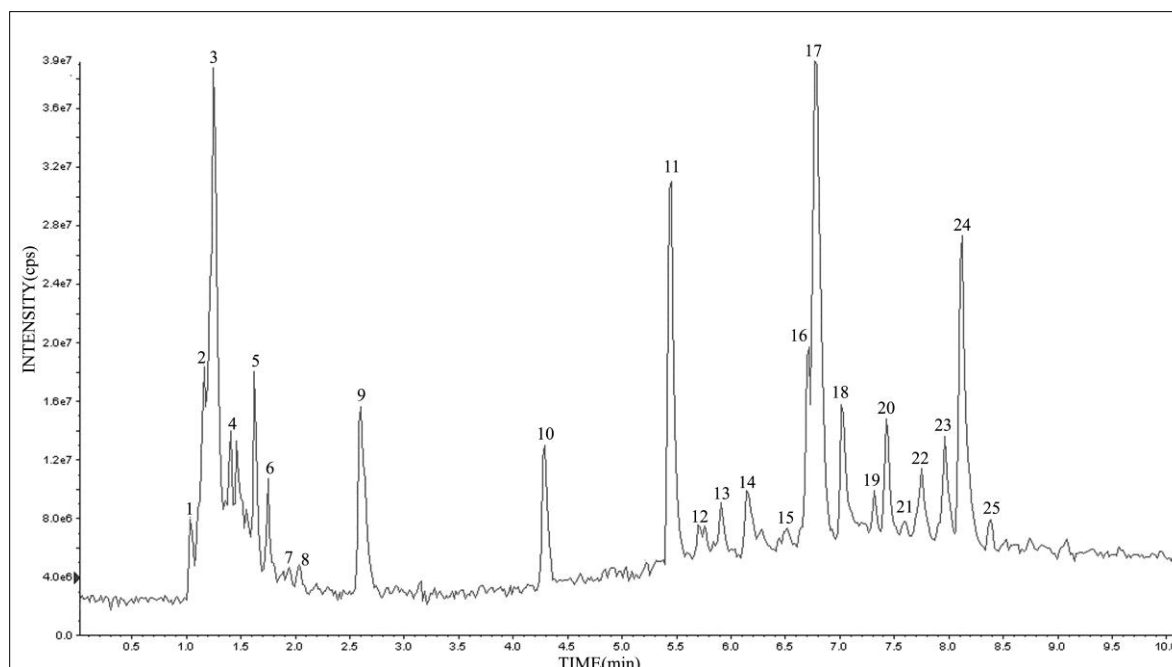
Tabela 6 i slika 7 prikazuju sastav fenola u ekstraktu zelenog čaja iz lišća. Zapaža se da spektri ekstrakata iz kapsula i ekstrakata iz lišća pokazuju značajne sličnosti. Glavna razlika leži u tome što fenolni ekstrakt lišća zelenog čaja sadrži značajnu količinu fenolnih kiselina, od kojih su najprisutniji derivati kinične i galne kiseline, kao i veće količine glikozida nekoliko flavonoida-kvercetina, kampferola, miricetina i sl.



Broj pika.	Retenciono vreme	Zastupljenost u ekstraktu (%)	m/z	Identitet jedinjenja
1	3.03	3.16	169	Galna kiselina
2	4.71	3.71	305	Galokatehin
3	5.82	17.22	305	(-) Epigalokatehin
4	6.32	2.77	289	Epikatehin/(+)katehin
5	6.57	0.55	577	Proantocijanidin B
6	7.11	n/a	289	epikatehin/katehin
7	7.17	38.33	915	(-)epigalokatehin galat
8	7.41	6.39	457	Galokatehin galat
9	8.14	1.45	471	Kamferol heksozid
10	8.30	0.64	431	Apigenin glukozid
11	8.53	20.57	883	Epikatehin galat
12	9.15	0.40	447	kamferol 3 glukozid /kvercetin ramnozid
13	9.51	1.78	425	Epiatzelehin galat

**Tabela 5. Fenolni sastav ekstrakta zelenog čaja iz komercijalnog suplementa**

Poređenjem spektara uočava se pomeranje retencionih vremena, koje se objašnjava efektima matriksa.



**Slika 7. LC-MS fenola ekstrakta iz lišća zelenog čaja**

peak no.	Retenciono vreme	% u ekstraktu	m/z glavne komponente	identitet jedinjenja
1	1.04	1.11	273	nepoznat
2	1.16	4.42	409	nepoznat
3	1.25	15.39	191	izomer kininske kiseline
4	1.40	1.19	173	teanin
5	1.62	2.71	191	kininska kiselina
6	1.74	1.62	257	nepoznati flavonoid
7	1.94	0.59	331	galoil-glukoza
8	2.03	0.57	609	teasinenzin c
9	2.59	6.57	343	galoilkininska kiselina, galna kiselina
10	4.28	3.63	305	galokatehin
11	5.44	10.74	305	(-) epigalokatehin
12	5.70	0.31	339	dimer galne kiseline
13	5.91	1.55	289	(+)katehin
14	6.15	1.79	577	proantocijanidin b
15	6.51	0.86	593	kampferol ramnozil galaktozid
16	6.71	n/a	289	(-)epikatehin
17	6.77	22.13	457	(-)epikatehin galat
18	7.02	3.44	457	galokatehin galat
19	7.31	0.78	479	miricetin 3-o-glucozid
20	7.42	2.85	771	kvercetin-o-glukozil-ramnozil galaktozid
21	7.59	0.42	755	kvercetin -o-diramnozil glukozid
22	7.74	2.35	771	kvercetin-o-galaktozil-ramnozil galaktozid
23	7.96	3.20	755	kamferol 3-o-galaktozilrutinozid
24	8.11	10.16	441	epikatehin galat
25	8.38	0.68	593	kamferol 3-o- ramnozil galaktozid

**Tabela 6. Fenolni sastav ekstrakta iz lišća zelenog čaja**

Rezultati dobijeni nakon hromatografskog razdvajanja i detekcije masenom spektrometrijom ekstrakta kapsula zelenog čaja potvrđuju da derivati epigalokatehin-3-galata i katehina čine više

od 75 % fenolnih jedinjenja ekstrakta, kao i da ovaj ekstrakt sadrži neznatne količine fenolnih kiselina (3,16 %), u poređenju sa ekstraktom lišća (24,98 %).

### 3.4 Fenolni sastav kore jabuke

#### 3.4.1 Uvod

Ispitivana je promena fenolnog sastava ekstrakta jabuke (*Malus domestica*) pod dejstvom enzima lakaze iz *Trametes versicolor*. Plod jabuke sadrži značajne količine polifenola, koji poseduju jake antioksidantne i potentne imunomodulatorne aktivnosti (Veeriah, Miene et al. 2008; Jung, Triebel et al. 2009), a naročito je bogat fenolnim kiselinama, kvercetinom i derivatima katehina (Kalinowska, Bielawska et al. 2014).

Cilj ovog segmenta istraživanja je utvrđivanje promena sastava koje nastaju dejstvom lakaze, kao i identifikacija potencijalno interesantnih fenolnih jedinjenja radi daljih ispitivanja njihovih imunomodulatornih svojstava.

#### 3.4.2 Materijal i metode

##### 3.4.2.1 Priprema ekstrakta fenola iz kore ploda jabuke

250mg ekstrakta kore jabuke iz komercijalnog preparata (Applepoly, USA) je rastvoreno u 5mL etanola HPLC čistoće. Nakon centrifugiranja tokom 15 minuta na 13400g dobijeni supernatant je analiziran tečno-masenom spektrometrijom. Komponente ekstrakta jabuke su identifikovane korišćenjem  $m/z$  vrednosti, UV/Vis apsorpcionih spektara i retencionih vremena. Količine fenola su procenjivane na osnovu površina ispod pika na hromatogramima. Ukupni fenoli ekstrakata zelenog čaja su određeni spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu-ovog reagensa (Merck, Darmstadt, Germany) (Ainsworth and Gillespie 2007) i izražavani su kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L ekstrakta.

##### 3.4.2.2 Polimerizacija fenola kore jabuke lakazom iz organizma *Trametes versicolor*

U cilju dobijanja polimernih katehina, fenoli jabuke su tretirani lakazom. Aktivnost lakaze je određena korišćenjem ABTS-a (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic kiselina)) kao supstrata (Selinheimo, Autio et al. 2007). 20  $\mu$ l rastvora lakaze (finalne koncentracije 0.1 mg/mL, 5000 U/ml) je dodato u 430  $\mu$ l fenolnog ekstrakta (50 mg GAE/mL) sa 0  $\mu$ l 200 mM acetatnog pufera pH 4.5. Nakon inkubiranja tokom 24 h na 37 C, smeša je centrifugirana tokom 15 min na 13400rpm i supernatant je dalje korišćen za LC-MS analizu.

**3.4.2.3 LC/MS analiza**

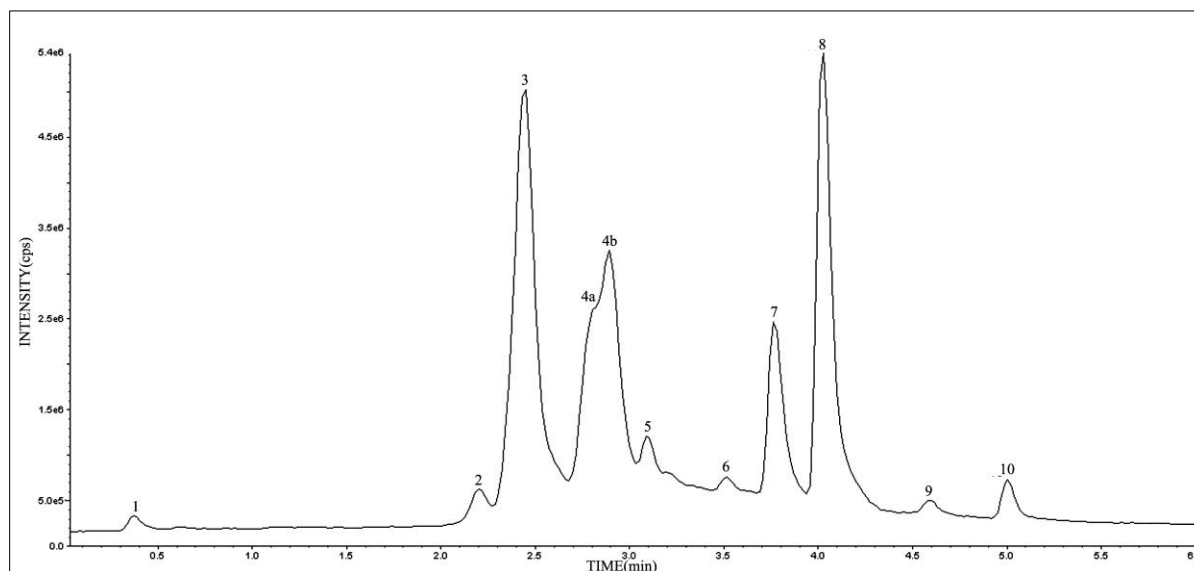
LC-MS analiza je izvedena na način koji je opisan u poglavlju 4.3.2.2

### 3.4.3 Rezultati i diskusija

Slika 8 i Tabela 7 prikazuju rezultate dobijene LC/MS analizom fenola kore jabuke.

Glavne komponente ekstrakta su hlorogena kiselina, glikozidi floretina i mono-, di-, i trimerni katehini. Kompozicija fenola iz kore jabuke korišćenih u ovoj studiji (Tabela 7) bila je slična prethodno opisanom sadržaju polifenola ekstrahovanih iz kore jabuke, mada je broj prisutnih komponenti manji usled ekstenzivnog prečišćavanja tokom proizvodnje korišćenog komercijalnog preparata (Huber and Rupasinghe 2009)

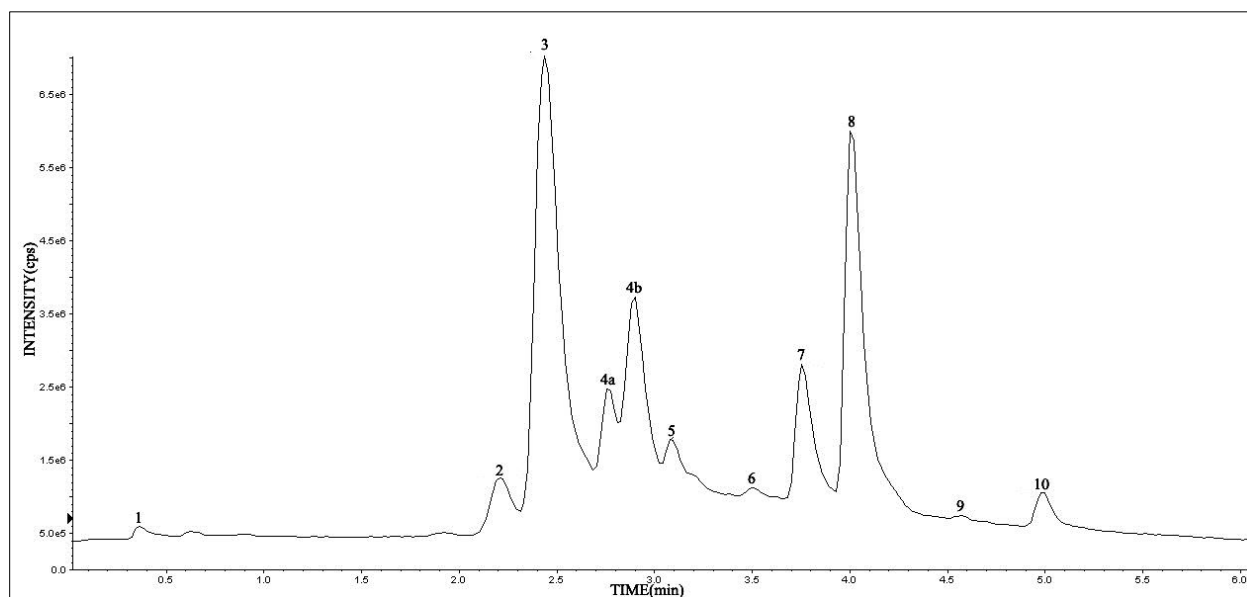
Fenoli jabuke su tretirani lakazom kako bi se analizirale promene fenolnog sastava do kojih dolazi. Izlaganje ekstrakta kore jabuke lakazi rezultiralo je polimerizacijom polifenolnih jedinjenja tako da je došlo do ekstenzivnog stvaranja taloga koji nije mogao biti dalje analiziran. Solubilna frakcija lakazom tretiranih polifenola je podvrgnuta LC-MS analizi. Tabela 8 i Slika 9 prikazuju identifikovane komponente. Može se primetiti da su LC-MS spektri tretiranog i netretiranog fenolnog ekstrakta jabuke veoma slični.



Slika 8. LC-MS hromatogram fenolnog ekstrakta kore jabuke

Broj pika	Retenciono vreme (min)	% u ekstraktu	m/z glavne komponente	Idenifikacija
1	0.37	0.56	191	kininska kiselina
2	2.20	1.57	577	proantocijanidin B
3	2.44	31.72	353	hlorogena kiselina
4	2.80	n/a	353	neohlorogena kiselina
4b	2.89	25.74	289	epikatehin, kumaril-kininska kiselina
5	3.09	3.63	865	proantocijanidin C
6	3.51	0.79	577	proantocijanidin B, kvercetin glukozid
7	3.77	8.97	567	floretin ksiloglukozid
8	4.02	23.35	435	floridzin
9	4.59	0.59	301	kvercetin
10	5.00	1.63	273	floretin

Tabela 7. Sastav fenolnog ekstrakta kore jabuke



Slika 9. LC-MS hromatogram fenolnog ekstrakta kore jabuke nakon tretmana lakazom

Broj pika	Retenciono vreme (min)	% u ekstraktu	m/z glavne komponente	Idenifikacija
1	0.3618	0.4064	191	kininska kiselina
2	2.2107	3.4179	577	proantocijanidin B
3	2.438	38.186	353	hlorogena kiselina
4a	2.7641	5.9226	353	neohlorogena kiselina
4b	2.894	14.1789	289	epikatehin, kumaril-kininska kiselina
5	3.0853	4.8057	865	proantocijanidin C
6	3.5038	0.5729	577	proantocijanidin B, kvercetin glukozid
7	3.7547	7.8507	567	floretin ksiloglukozid
8	4.0081	22.8885	435	floridzin
9	4.588	0.31	301	kvercetin
10	4.986	1.7704	273	floretin

**Tabela 8. Sastav fenolnog ekstrakta kore jabuke nakon tretmana lakazom**

Jedina značajna razlika se ogleda u sadržaju (-)epikatehina u uzorku tretiranom lakazom, koji je opao sa 25.74% do 14.17% od ukupnog fenolnog sadržaja nakon tretmana lakazom. Uočava se i neznatan porast koncentracije procijanidina C (trimerni epikatehin) – sa 3.63 na 4.8% nakon enzimskog tretmana, što ukazuje na to da je e došlo do polimerizacije uz smanjenje količine katehina i porast koncentracije viših oligomera. Oligomeri koji sadrže više od 3 monomera katehina nisu detektovani, verovatno usled primenjene tehnike jonizacije i/ili precipitacije iz reakcione smeše.

Rezultati dobijeni nakon hromatografskog razdvajanja i detekcije masenom spektrometrijom fenolnog ekstrakta jabuke pre i nakon tretmana lakazom pokazuju da ovaj enzim dovodi do polimerizacije mahom epikatehina, usled njegove visoke hemijske reaktivnosti. Polimerizacijom epikatehina nastaju nerastvorni polimeri velikih molekulskih masa.

## 4 Enzimsko umrežavanje proteina kikirikija

### 4.1 Optimizacija reakcija umrežavanja

#### 4.1.1 Uvod

Kikiriki (*Arachis Hypogea*) je medju najvažnijim prehrambenim proizvodima moderne industrije hrane. Upotreba kikirikija i različitih derivata ove namirnice mogu predstavljati problem zbog povećane incidence alergija na kikiriki. Ispitivanje uticaja enzimskog tretmana na funkcionalna svojstva hrane je jedna od centralnih tačaka moderne industrije hrane. Medju najvažnijim osobinama hrane su alergenost i svarljivost u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta.

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija enzimski umreženih proteina kikirikija, koji će biti analizirani kako bi se ustanovile promene u alergenosti i svarljivosti.

Prethodnim istraživanjima je utvrđeno da proteini kikirikija imaju različite osobine pri umrežavanju u nativnom stanju i nakon toplotnog tretmana (Cabanillas, Cuadrado et al. 2015), kao i da se rastvorljivost pojedinačnih proteina kikirikija menja u pH intervalu 6-8. U ovom opsegu pH brojni enzimi koji se koriste u industriji imaju svoj optimum aktivnosti. Kako bi se iznašli optimalni uslovi sinteze umreženih proteina kikirikija, isprobane su različite kombinacije reakcionih uslova, koje uključuju pH, toplotni tretman proteina kikirikija, količina enzima i trajanje enzimske reakcije.

#### 4.1.2 Materijal i metode

##### 4.1.2.1 Ekstrakcija proteina kikirikija

500g sirovog kikirikija je samleveno i odmašćeno sa 2x500mL acetona. Odmašćeni kikiriki je osušen na sobnoj temperaturi i ekstahovan sa 1200mL 50mM amonijum bikarbonatnog pufera pH 8.0 tokom 3 sata na 4°C. Smeša je filtrirana, nakon čega je centrifugirana 40 minuta na 5000g. Vodeni sloj je zamrzavan na -80°C i liofilizovan. Ovaj material je korišćen u daljem radu.

##### 4.1.2.2 Postavka reakcija

Liofilizovani materijal (ekstrakt proteina kikirikija) je rastvaran u 100mM puferu, koncentracija proteina je prilagodjena na 5 mg/mL, prema modifikovanoj metodi po Loriju (Hartree 1972).



Sve reakcione smeše su inkubirane na 40°C. Kako bi se odredili optimalni uslovi za enzimsku modifikaciju proteina, postavljane su reakcione smeše na različitim pH vrednostima (pH 6-8) kao i sa različitim reakcionim vremenima (2, 6, 24h). Osim toga, u pojedine reakcione smeše dodavan je fenolni medijator u formi 1mM kafeične kiseline. Enzimi su dodavani u dve koncentracije aktivnosti – 100 i 1000 nkat/g proteina.

Sve reakcije su zaustavljane zamrzavanjem (-20°C), i alikvoti uzoraka su pre koraka zamrzavanja odmah pripremani za SDS-PAGE ubacivanjem 10uL u 40uL redukujućeg pufera za uzorke. Umrežavanje je praćeno SDS PAGE analizom na 12% poliakrilamidnim gelovima, u redukujućim uslovima.

Paralelno su praćene i reakcione smeše u kojim nije dodavan enzim.

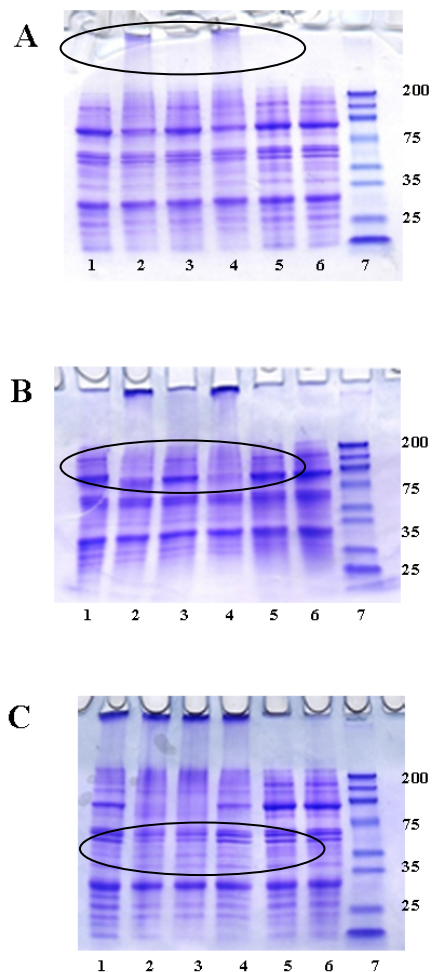
#### **4.1.3 Rezultati i diskusija**

Slika 10 prikazuje SDS-PAGE gelove nakon bojenja.

Obim umrežavanja je vizuelno procenjivan sa SDS-PAGE gelova. Posebna pažnja je obraćana na trake promenjenog intenziteta u poredjenju sa kontrolnim uzorkom, kao i na aggregate visokih molekulskih masa (a koji se mogu uočiti u koncentrujućem gelu oko bunara za uzorke). Uočava se da sa produžavanjem trajanja reakcionog vremena dolazi do slabljenja intenziteta pojedinih proteinskih traka, kao i nastanka veće količine visokomolekulskih agregata.

Utvrđeno je da je fenolni sadržaj rastvora liofilizata koji je korišćen za reakcije 1.03mg/mL, I može se izraziti kao 6mM ekvivalent koncentracije galne kiseline. Dodatak kafeične kiseline se ispostavio kao nebitan za tok reakcije, jer su fenoli koji su prirodno prisutni u ekstraktu efikasni medijatori ovih enzimskih reakcija.

Izabrani su uslovi za proizvodnju većih količina umreženih proteina. Korišćeno je 1000nkat/g proteina, uz period inkubacije od 24h, na temperaturi od 40°C. Usled prisustva velike količine fenolnih jedinjenja, kafeična kiselina nije dodavana.



**Slika 10. SDS-PAGE proteina kikirikija nakon A) 2h, B) 6h, C) 24h. Uzorci 1. Proteini kikirikija+ 100nkat/g enzima 2. Proteini kikirikija+ 100nkat/g + 1mM kafeična kiselina 3 Proteini kikirikija+ 1000nkat/g enzima 4. Proteini kikirikija+ 1000nkat/g + 1mM kafeična kiselina 5. . Proteini kikirikija 6. Proteini kikirikija + 1mM kafeična kiselina 7. Markeri. Elipsa označava agregate visoke molekulske težine.**

## 4.2 Karakterizacija proteina kikirija dobijenih dejstvom lakaze

### 4.2.1 Uvod

Do umrežavanja proteina u hrani može doći prirodno, tokom prerade hrane, ili izlaganjem prirodnim kontaminantima (Singh 1991; Buchert, Ercili Cura et al. 2010; Aldini, Orioli et al. 2011; Hu, Ren et al. 2011; Reddy, Jiang et al. 2012). Enzimsko umrežavanje proteina koje dovodi do nastajanja agregata proteina (ili drugih jedinjenja prisutnih u hrani) visoke molekulske težine se često koristi u industriji žitarica, mlečnih proizvoda, mesa i ribe, kako bi se poboljšale

mehaničke i funkcionalne osobine hrane (Buchert, Ercili Cura et al. 2010). Iako je enzimsko umrežavanje proteina predmet istraživanja velikog broja naučnih grupa, malo se zna o osobinama modifikovanim proteina hrane visoke molekulske težine. Menjanje proteinskih struktura je neophodno za stvaranje novih funkcionalnih osobina hrane, ali sa sobom nosi rizik nastanka hrane sa izmenjenim imunogenim potencijalom. Novi proteini i derivati proteina se moraju testirati kako bi se pravilno procenio alergeni potencijal nove hrane u odnosu na mogućnost razvoja *de novo* hiperosetljivosti, kao i prevencije povećanog alergenoog potencijala za alergene koji su već prisutni u hrani (FAO/WHO. 2001).

Ispitivanja efekata procesovanja hrane na alergnost proteina hrane se najčešće vrši merenjem vezivanja IgE antitela. Uticaj efekata procesovanja na senzitivaciju se ispituje na životinjskim modelima alergije, dodavanjem prečišćenih proteina hrane, ekstrakata hrane ili čistih alergena, sa ili bez elemenata prirodnog matriksa hrane (Kroghsbo, Rigby et al. 2014; Radosavljevic, Nordlund et al. 2014; Stojadinovic, Pieters et al. 2014).

Kikiriki je važan sastojak mnogih dijeta, i jedna od najvažnijih namirnica industrije hrane. Proteini kikirikija su široko dostupni i mogu se tretirati enzimskim ili hemijskim sredstvima, kako bi se dobili filmovi, vlakna, nanočestice i slični materijali za različite aplikacije (Reddy, Jiang et al. 2012). Upotreba proteina kikirikija takodje predstavlja i ozbiljan zdravstveni rizik, usled činjenice da je alergija na kikiriki najrasprostranjenija alergija na hranu, sa procenjenom prevalencom od 1-2% ukupne populacije, i čak do 8% populacije dece. (Ortolani, Ispano et al. 2001). Ova alergija je i čest uzrok fatalnih anafilaktičkih reakcija na hranu (Burks 2008).

Efekti enzimskog umrežavanja na vezivanje humanog IgE za alergene kikirikija su opisani u nekoliko radova. Poznato je da transglutaminaza smanjuje vezivanje imunoglobulina za alergene kikirikija disperzijama brašna od kikirikija koje sadrže kazein (Clare, Gharst et al. 2008). Tretman proteina kikirikija kikirikija transglutaminazom je rezultovao izmenjenim osobinama proteina, uz nastajanje oligomera i polimera visoke molekulske težine, ali bez značajnih izmena u imunogenom odgovoru (Clare, Gharst et al. 2007). Slični rezultati su dobijeni za tretman alergena kikirikija kombinacijom tirozinaze iz *A. bisporus* i kafeične kiseline, kao i tirozinaze iz *T. reseei* (Chung, Kato et al. 2005; Radosavljevic, Nordlund et al. 2014).

Nekoliko skorijih studija ispituje efekte enzimskog umrežavanja na senzitivacioni potencijal proteina hrane, i njihovi rezultati daju neujednačenu sliku efekata do kojih dolazi. Tretman proteina kikirikija tirozinazom, ili kazeina iz mleka transglutaminazom ne dovodi do promena senzitivacionog potencijala kod životinjskih modela alergija na hranu (van Esch, Gros-van Hest et al. 2013; Radosavljevic, Nordlund et al. 2014). S druge strane, tretman beta-

laktoglobulina lakazom dovodi do porasta imunogenosti i alergenosti na glavni alergen mleka (Stojadinovic, Pieters et al. 2014).

Cilj ovog rada je bio rasvetljavanje efekata umrežavanja proteina kikirikija dejstvom lakaze, kako bi se ispitali efekti na strukturu proteina kikirikija, biodostupnost i imunogeni i senzitivizacioni potencijal. Kako je lakaza enzim koji može da reaguje sa fenolnim jedinjenjima prisutnim u uzorku, analiziran je i sastav polifenola kikirikija pre i posle enzimske reakcije.

## 4.2.2 Materijal i metode

### 4.2.2.1 Hemikalije i standardi

Ukoliko nije drugačije navedeno, sve hemikalije je proizvela Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i bile su analitičke čistoće ili bolje .

### 4.2.2.2 Ekstrakcija kikirikija i reakcija umrežavanja

700g sirovog kikirikija (*Arachis hypogea*) je samleveno i odmašćeno sa 2x 1L acetona, nakon čega je materijal osušen na sobnoj temperaturi preko noći. Odmašćeni materijal je ekstrahovan sa 2L 50mM amonijum bikarbonatnog pufera pH 8 tokom 3 sata na 4°C, nakon čega je centrifugiran na 5000g tokom 30 minuta. Ovaj supernatant je korišćen u daljem radu. Koncentracija proteina u ekstraktu kikirikija je merena modifikovanom komercijalnom metodom po Loriju (Biorad).

SDS-PAGE je izvodjen na 12% poliakrilamidnim gelovima prema standardnoj proceduri (Laemmli and Quittner 1974), kako bi potvrdili da nije došlo do promena u materijalu, kao i da postoji podudarnost sa prethodno sintetisanim umreženim materijalima.

Reakcije umrežavanja su izvodjene sa 1000 ncat/g proteina tokom 24h na 40°C, u puferima za koje je prethodno utvrđeno da su optimalni za enzim. Reakcije su izvodjene u 100mM natrijum fosfatni pufer pH 7 za lakazu.

### 4.2.2.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija i elektroforetska analiza dobijenog materijala

Rastvori koji sadrže 1 mg/mL proteina u PBS (određeno BCA testom) su osušeni na vazduhu i prekriveni zlatom katodnim prskanjem (LEICA SCD005, Leica Microsystems, Nemačka). Morfologija materijala je analiziran skenirajućim elektronskim mikroskopom (JSM - 6610LV, Jeol, Peabodi, MA, SAD). Posmatranje je urađeno pod sledećim uslovima: uvećanje 20000k, 30 kV, VD = 7 i signala= SEI .

SDS - PAGE (natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu) na 8 i 12 % gelovima je izvedena u skladu sa referencom (Laemmli 1970), koji su obojeni bojom Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva Elektroforeza GmbH, Heidelberg, Nemačka). Za upoređivanje uzoraka u opsegu većih molekulskih masa, izvedena je elektroforeza na 1 % agaroznom gelu, sa molekulskim markerima napravljenih od miofibrilarnih proteina miša (Warren, Krzesinski et al. 2003). U svim elektroforetskim analizama nanošeno je 40 ug proteina (određeno BCA testom) po bunaru .

#### **4.2.2.4 Odredjivanje modifikacije epitopa kikirikija dejstvom lakaze**

##### **4.2.2.4.1 Inhibitorna ELISA sa poliklonskim antitelima**

Inhibitorne ELISA sa poliklonskim zečjim serumima na pojedinačne alergene su izvedene kao što je prethodno opisano, uz modifikacije (Schmitt, Cheng et al. 2004). Ukratko, ploče su preko noći inkubirane sa proteinima kikirikija i blokirane sa 1 % BSA u 0.1 % Tween-TBS tokom 2 h. Umreženi proteini kikirikija su pripremljeni u desetstrukim serijskim razblaženjima (opseg od  $1 \cdot 10^{-7}$  mg/mL (suva težina/zapremina)) i inkubirani 1 sat sa antitelima na Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6 na sobnoj temperaturi. Preinkubirana antitela naneta na ploču, inkubirana 1 h i isprana. Zatim su ploče inkubirane sa kozijim anti-zečjim antitelima obeleženim sa alkalnom fosfatazom (AP) tokom 1 h i ELISA je vizualizovana sa p - nitrofenil-fosfatom. Absorbanca na 405 nm je merena 2 h posle dodavanja supstrata.

Procenat inhibicije (% inhibicije) je izražen kao:  $((A_{405} \text{ neinhibiranog uzorka} - A_{405} \text{ inhibiranog uzorka})/A_{405} \text{ neinhibiranog uzorka}) \times 100 \%$  .

Primarna poliklonska IgG antitela na alergene kikirikija, proizvedena u zečevima, poklon su dr Maarten Pennings-a, Univerzitetski medicinski centar u Utrehtu, u Holandiji .

##### **4.2.2.4.2 Anti - IgE inhibitorna ELISA**

Koncentracije proteina u ekstraktu kikirikija i umreženim ekstraktima kikirikija podešene su na 1.5 mg/ml prema BCA testu.

Za ELISA inhibiciju je korišćena je smeša seruma od pacijenata alergičnih na kikirikiki. Dobijena je mešanjem jednakih zapremina seruma 14 osoba sa ukupnim nivoima IgE antitela na kikiriki: 24.2 kU/L, 86.5 kU/L, 18.6 kU/L, 14.0 kU/L, 5,5 kU/L, > 100 kU/L, 4.9 kU/L, 42.2 kU/L, > 100 kU/L, 2.3 kU/L, < 0,35 kU/L, 1.0 kU/L, 10.01 kU/L, 22.0 kU/L. Ekstrakt kikirikija i

umreženi ekstrakti kikirikija pripremljeni su u desetstrukim serijskim razblaženjima i prethodno inkubirani tokom 1 h sa smešom seruma finalno razblaženom 60 puta .

Inhibitorna ELISA je izvedena kao što je prethodno opisano (Koppelman, Vlooswijk et al. 2001). Ukratko, ELISA ploče su preko noći inkubirane sa proteinima kikirikija u PBS-u. Nakon ispiranja i blokiranja sa 1 % BSA u PBS sa 0.1 % Tween 20, serumi inkubirani sa PE, TA ili TT su naneti na ploču i inkubirani tokom 2 časa. Nakon toga, ploče su isprane i inkubirane sa kozjim - anti - humani IgE - HRP konjugovanim antitelima (PharMingen, San Diego, SAD) tokom jednog sata. ELISA je vizualizovana sa rastvorom tetrametilbenzidin (TMB) supstrata i zaustavljena posle 15 min sa 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i izmerena je ašorbanca na 450 nm. Procenat inhibicije (% inhibicije) je izražen kao:  $((A_{450} \text{ ne inhibiranog uzorka} - A_{450} \text{ inhibiranog uzorka})/A_{450} \text{ neinhibiranog uzorka}) \times 100 \%$  .

#### 4.2.2.4.3 Test aktivacije bazofila

Heparinizovani uzorci krvi (100 µl) inkubirani sa serijskim razblaženjima kazeina (50, 5, 0.5 i 0.05 mg/mL) i umreženog kazeina (50 mg/mL), anti - IgE antitelom kao pozitivnom kontrolom ( 1 mg / mL ), ili PBS-om kao negativnom kontrolom tokom 15 min (37 °C) . Posle inkubacije, ćelije su isprane sa PBS-om i potom inkubirane sa 10 µL fikoeritrin - obeleženim CD203c monoklonskim antitelom 97A6 (Immunotech) i FITC – obeleženim CD63 monoklonskim antitelom (Immunotech) tokom 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, uzorci su podvrgnuti lizi eritrocita sa 2ml FACS™ rastvorom za lizu (BDBiosciences, SAD). Ćelije su zatim isprane, resuspendovane u PBS-u i analizirane protočnom citometrijom upotrebom FACSCalibura (BD Biosciences). Marker bazofila CD203c je korišćen za identifikaciju populacije. Sekretija granula je analizirana iz prikupljenih ćelija korišćenjem anti-CD63 antitela. Aktivacija bazofila je izračunata kao procenat CD63+ događaja bazofilima (CD63+/CD203c+ ćelije). Rezultati su izraženi na sledeći način: (aktivacija bazofila uzorkom/aktivacija bazofila u pozitivnoj kontroli (anti-IgE)) x 100.

#### 4.2.2.5 *Određivanje Ara h 2 h 6 i Ara transportovanog preko Caco-2 ćelijskog monosloja*

Koncentracija Ara h 2 i Ara h 6, kao i fragmenata izvedenih iz ovih proteina u bazolateralnim kompartmentima Caco- 2 ćelija su određeni kompetitivnom inhibitornom ELISA-om, kao što je opisano ranije (Schmitt, Cheng et al. 2004). Ukratko, ploče su preko noći inkubirane sa Ara h 2 ili Ara h 6.. Alikvoti medijuma koji sadrži peptide dobijene od 2 h do 4 h

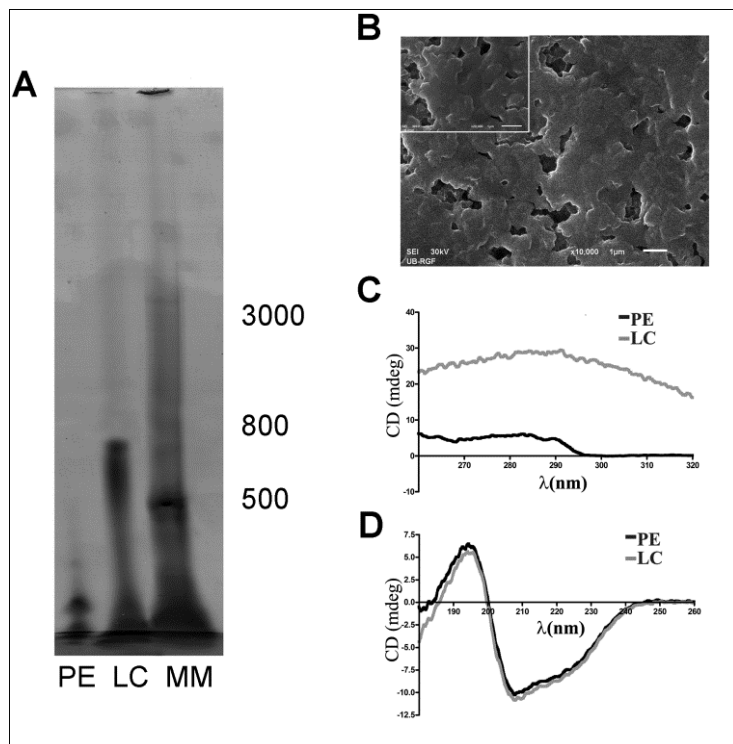
sata transcitoze su inkubirani sa odgovarajućim zečjim poliklonskim antitelima do finalnog razblaženja uzorka od 10 puta. Smeša antitela i uzoraka supernatanata su dodati u bunare i inkubirani 2 sata na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja, anti - zečje antitelo kuplovano sa alkalnom fosfatazom (ABD Serotec, Oksford, Ujedinjeno Kraljevstvo) u 1 % BSA u PBS – Tween-u je dodato u svaki bunar i inkubirano preko noći na 4 °C. ELISA je razvijena sa p - nitrofenil - fosfatom i apsorbancije na 405 nm je merena. Standardne krive inhibicije su pripremljene sa antitelima inkubiranim sa prečišćenom Ara h 2 i Ara h 6, pripremljenim u petostrukim serijskim razblaženjima počev od 25 i 10 µg/mL, redom. Merenja za svaki uzorak su urađena u triplikatu. Procenti inhibicije za PE i umrežene proteine su izračunate u odnosu na kontrolni uzorak koji sadrži samo medijum u transportnim studijama .

### 4.2.3 Rezultati

#### 4.2.3.1 *Tretman alergena kikirikija lakazom dovodi do umrežavanja proteina i promena u njihovoj strukturi*

Enzimski tretman ekstrakta proteina kikirikija lakazom dovodi do porasta molekulske težine ovih proteina. Kako bismo procenili molekulsku težinu agregata umreženih proteina kikirikija izvedena je elektroforeza na agaroznom gelu. Proizvodi dobijeni dejstvom lakaze su imali velike molekulske težine, sa jasno vidljivim trakama od oko 800kDa. Mogu se zapaziti i trake težina oko 1000 kDa, kao i veće. Radi dobijanja daljih informacija o makroskopskim osobinama modifikovanih proteina korišćena je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). Rezultati SEM su pokazali da uzorak tretiran lakazom poseduje sundjerastu strukturu, uz formiranje gušćih zona na pojedinim delovima uzorka.

Spektri bliske-UV CD pokazuju opsežne razlike u tercijarnoj strukturi izmedju uzoraka. Oblik i intenzitet bliskog-UV CD spektra su obično distortovani diferencijalnim rasipanjem svetla, i smanjenjem apsorpcije do koje dolazi usled visoke koncentracije proteina u agregatima. Nasuprot ovoj situaciji, daleki- UV CD spektri, kod kojih promene koreliraju sa promenama u sekundarnoj strukturi, pokazuju jako male razlike izmedju uzorka tretiranog lakazom i kontrolnog uzorka. CD spektrometrija je pokazala da tretman proteina kikirikija lakazom ne remeti sekundarnu strukturu proteina, ali da dolazi do promena u tercijarnoj strukturi.

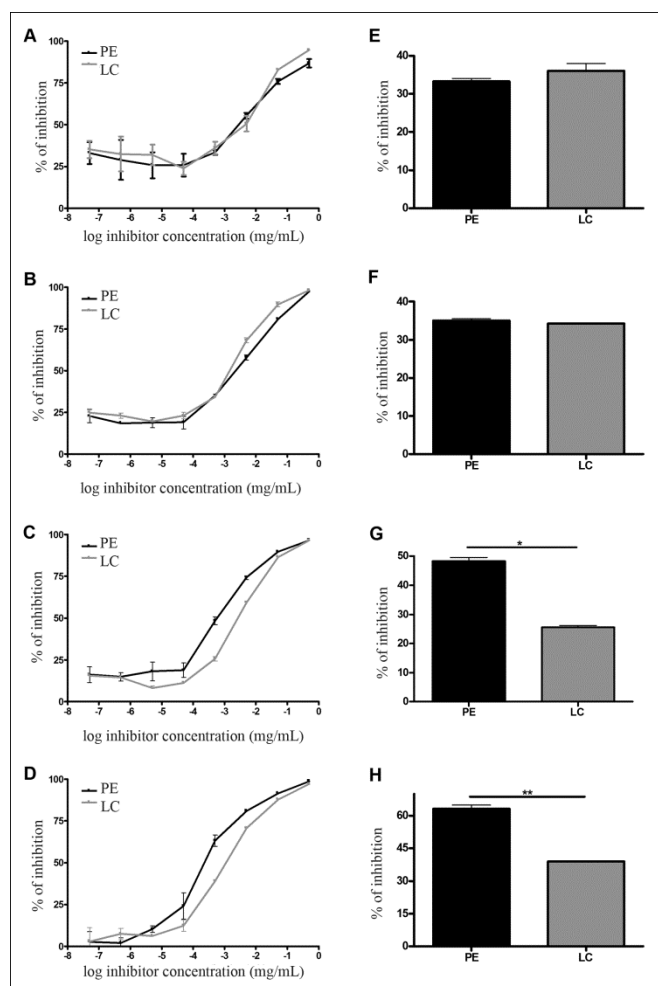


**Slika 11. Karakterizacija lakazom umreženih proteina kikirija:**  
**A. elektroforeza. B. SEM. C. CD spektri lakazom tretiranog**  
**kikirija u bliskoj UV oblasti. D. CD spektri lakazom tretiranog**  
**kikirija u dalekoj UV oblasti**

#### 4.2.3.2 Modifikacija epitopa glavnih alergena kikirikija lakazom

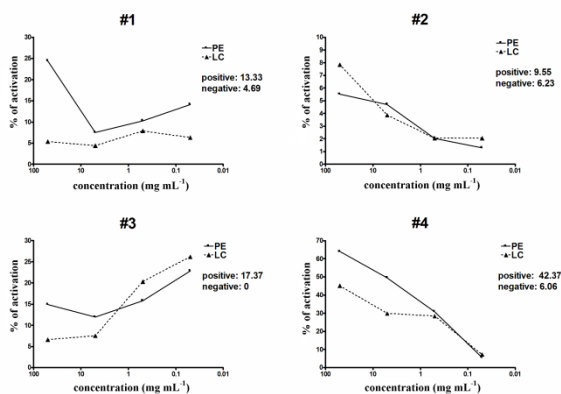
Promene tercijarne strukture uzrokovane umrežavanjem lakazom mogu da utiču na antigenske epitope glavnih alergena kikirikija. Obim modifikacije epitopa pojedinačnih alergena kikirikija je procenjen inhibitorom ELISA-om sa antitelima specifičnim za pojedinačne alergene. Odredjene su IC50 vrednosti (kao mera sposobnosti uzorka da inhibira vezivanje specifičnih antitela za Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 i Ara h 6). Najintenzivnija modifikacija epitopa je zapažena za Ara h 3 i Ara h 6. Na linearnom delu krive vezivanja najsnažniji inhibicioni potencijal je statistički značajno smanjen ( $p < 0.01$  za Ara h 3 i  $p < 0.05$  za Ara h 6) kod uzoraka tretiranih lakazom, u poredjenju sa netretiranim proteinima kikirikija. IC50 vrednosti za Ara h 1 i Ara h 2 su približno iste kod tretiranih i netretiranih uzoraka, što dovodi do zaključka da su ova dva alergena neizmenjena tretmanom umrežavanja lakazom



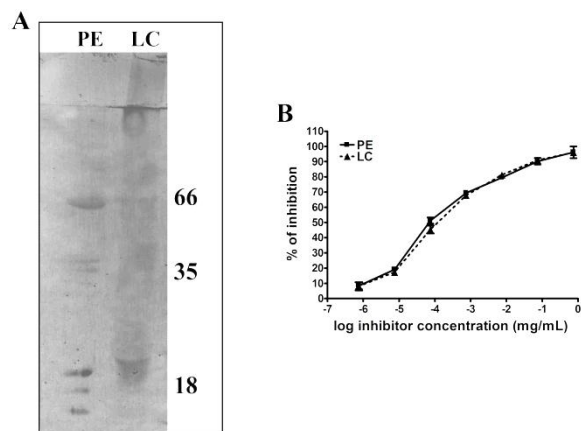


**Slika 12. ELISA inhibicija zečjeg anti-Ara h 1(A), antizečjeg anti-Ara h 2(B), antizečjeg anti-Ara h 3/4(C), antizečjeg anti-Ara h 6(D) ekstrakta kikirikija i umreženog ekstrakta kikirikija (rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD). Vrednosti ELISA inhibicije inhibitorom pri koncentraciji od 0.5  $\mu$ g/mL inhibitor (linearni deo inhibitorne krive) za anti-Ara h 1 (E), anti-Ara h 2 (F), anti-Ara h 3/4 (G) i anti-Ara h 6 antitela. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$**

Uticaj na vezivanje IgE nije bio značajan, što je pokazano testovima aktivacije bazofila i testovima inhibicije IgE vezivanja.



**Slika 13.** Test aktivacije bazofila 4 pacijenta alergičnih na kikiriki ekstraktom kikirija i lakazom-umreženog kikirija.



**Slika 14.** Očuvanje vezivanja humanog IgE za dobijeni lakazom umreženi ekstrakt kikirija: (A) Imunoblot i (B) inhibitona ELISA sa smešom humanih seruma (n=14).

Tabela 9 prikazuje rezultati dobijenih IC<sub>50</sub> vrednosti u testovima kompetitivne ELISA upotrebom alergena.

Inhibitor	IC <sub>50</sub> vrednosti u testovima kompetitivne ELISA upotrebom alergen-specifičnih antitela:			
	anti-Ara h 1	anti-Ara h 2	anti-Ara h 3	anti-Ara h 6
PE	0.58	0.47	0.98	0.19
LC	3.98	0.22	6.18	0.68

**Tabela 9.** IC<sub>50</sub> vrednosti u testovima kompetitivne ELISA upotrebom alergen-specifičnih antitela (µg mL<sup>-1</sup> inhibitora). Vrednosti su srednje vrednosti tri replikata.

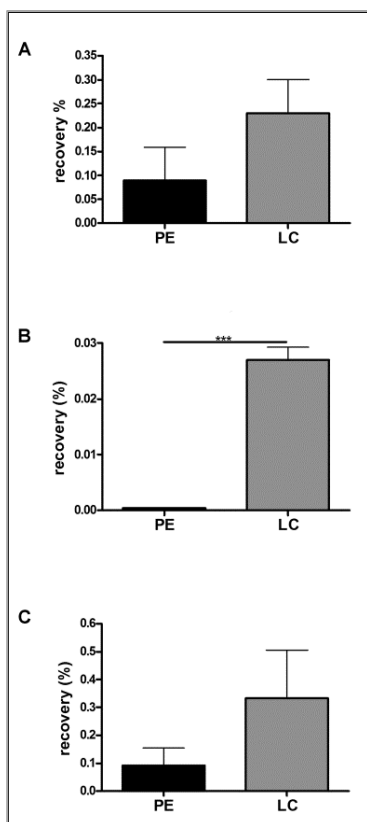
#### 4.2.3.3 Epitelni transport umreženih proteina kikirikija

Epitelni transport umreženih proteina kikirikija je analiziran na model sistemu jednoslojnih Caco-2 ćelija crevnog epitela, merenjem transporta proteina obeleženih FITC-om, kao i merenjem koncentracije specifičnih alergena (Ara h 2 i Ara h 6) u bazolateralnom odeljku korišćenjem inhibitorne ELISA-e. Nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji FITC-obeleženih proteina u bazolateralnom odeljku između netretiranih i uzoraka tretiranih lakazom. Nasuprot tome, uočeno je veliko povećanje koncentracije Ara h 2 alergena u uzorku tretiranom lakazom ( $p < 0.001$ ). Koncentracija Ara h 2 u bazolateralnom odeljku se razlikovala i do 70 puta. Sličan trend je uočen kod alergena Ara h 6, ali rezultati nisu statistički značajni (Slika 15)

#### 4.2.4 Diskusija

Ispitivan je efekat unakrsnog povezivanja lakazom na strukturu proteina kikirikija, adsorpciju od strane enterocita i sposobnost da vezuju humani IgE i indukuju aktivaciju bazofila alergičnih pacijenata. Lakaza je enzim koji može da koristi polifenole kao pomoćne supstance za reakciju umrežavanja, tako da je analiziran i sastav kikirikija polifenola pre i nakon enzimske reakcije.

Pokazano je da lakaza, koristeći samo polifenole kikirikija, efikasno unakrsno povezuje proteine



**Slika 15. Biodostupnost PE i umreženih materijala u Caco-2 ćelijskoj liniji: A) ukupna biodostupnost; B) biodostupnost Ara h 2; C) biodostupnost Ara h 6. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  prema t-testu, rađeno u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija**

kikirikija . Veći agregati, s molekulskom masom od 500-800 kDa i oko 1000 kDa su dobijeni delovanjem lakaze nego dejstvom transglutaminaze ili tirozinaze na proteine kikirikija (Yu, Ahmedna et al. 2011). Poboľšano unakrsno povezivanje dejstvom lakaze može se objasniti kovalentnom ugradnjom polifenola kikirikija CD spektroskopska analiza je pokazala da su glavni efekti lakaze na tercijarnu strukturu proteina, dok se samo umerene promene mogu uočiti na nivou sekundarne strukture.

Posebno velika promena tercijarne strukture glavnih alergena kikiriki proteina primećena je za Ara h 3 i Ara h6 alergene, sudeći prema smanjenom vezivanju specifičnih antitijela. Ara 2 h pokazao je najmanju sklonost da se modifiku jelazom. Kako je u pitanju dominantan alergen kikirija, ovaj rezultat može da objasni marginalne efekte dejstva lakaze na IgE vezivanje unakrsno-povezanih alergena kikirikija.

Postoji nekoliko mehanizama preuzimanja kojim intaktnih solubilni alergeni i njihovi peptidi mogu proći epitelnu barijeru i dođu do imunog sistema i indukuju alergijske reakcije kod osetljivih osoba. Transcelularni transport omogućava velikim antigenim molekulima da prođu do u subepitelni deo i interaguju sa lokalnim ćelijama imunskog sistema (Perrier and Corthesy 2011; Berin and Sampson 2013).

U ovom radu (i ranijim radovima ((Radosavljevic, Nordlund et al. 2014)) pokazano je da nativni PE ima veoma nisku biodostupnost u ćelijskom modelu epitelne transcitoze. To ukazuje da alergeni kikirikija, poput drugih proteina hrane sklonih agregaciji, takođe mogu koristiti i druge oblike transporta osim transcitoze kroz enterocite (tj. preko M ćelija povezanih sa Pejerovim pločama) (Untersmayr, Diesner et al. 2010; Berin and Sampson 2013).

Umrežavanje i agregacija glavnih alergena kikirikija nisu promenili transepitelni prolaz. Nasuprot tome, proteini kikirikija su pokazali povećanu biodostupnost nakon umreženosti. Ara h 2 h i Ara h 6 su kvantifikovani kompetitivnom inhibitorom ELISA-om u Caco-2 ćelijskim efluentima. Specifično dejstvo lakaze olakšava transport Ara h 2 kroz Caco- 2 monosloj, u poređenju sa nativnim PE, ali ne utiče na transport Ara h 6. Među glavnim alergenima kikirikija, Ara h 2 i Ara h 6 su bili najjači alergeni kikirikija *in vivo* i glavni izazivači anafilakse koja je odgovarala većini efektorske aktivnosti u sirovom ekstraktu kikirikija kada je testiran sa RBL SX-38 ćelijama koje su senzibilisane IgE antitelima izolovanim iz seruma alergičnih ljudi (Blanc, Adel-Patient et al. 2009). Prethodna transportna studija strukturno sličnih alergena, 2S albumina brazilskog oraha i susama (Ber e 1 i Ses i 1) otkrila je da se ovi proteini transportuju preko

intaktnog monosloja Caco-2 (Moreno, Rubio et al. 2006). Na ovaj način kapacitet umreženih alergena kikirikija za dalje izazivanje alergijske senzitivacije može biti povezan sa zadržanim (pa čak i olakšanim) transportom glavnih alergena kikirikija. Slično, pokazano je da zagrevanje prečišćenog Ara h 2 dovodi do agregacije proteina i povećava adsorpciju na enterocite (Starkl, Krishnamurthy et al. 2011).

Nedavna studija je pokazala da ekstrakt kikirikija koji je bogat proteinima može smanjiti biodostupnost drugih alergena. Autori su pokazali da proteini kikirikija inhibiraju apsorpciju Bos d 5, Mal d 1 i Cor a 8 u Caco-2 ćelijskom modelu (Schulten, Lauer et al. 2011). Neki aromatični etil estri i peptidi mogu da inhibiraju Caco-2 ćelijsku apsorpciju različitih alergena (Kobayashi and Watanabe 2003). Ovo upućuje da epitelni transport glavnih alergena kikirikija može biti inhibiran matriksom kikirikija i ostalim nealergenim proteinima kikirikija, peptidima i jedinjenjima male molekulske mase, odnosno polifenolima, prisutnim u ekstraktu (Schulten, Lauer et al. 2011) na koje se utiče tretmanom lakazom. Uklanjanje fenolnih jedinjenja iz ekstrakta kikirikija, je olakšalo transport glavnog alergena Ara h 2., kao što smo prikazali ispitivanjem dejstva lakaze na polifenole kikirikija

## 5 Komparativna analiza proteoma *Ambrosia artemisiifolia* polena i subpolenskih čestica

### 5.1.1 Uvod

Do sada je sproveden veliki broj istraživanja u pokušaju da se razumeju uzroci i razviju terapije alergijskih poremećaja izazvanih polenom *Ambrosia artemisiifolia* L. (kratka ili obična ambrozija *A. artemisiifolia* L.), koja je najvažniji sezonski alergen u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama. Alergije na ambroziju izazivaju rinitis, konjunktivitis, astmu i bitan je faktor u nastanku atopijskog dermatitisa. Procenjuje se da globalno čak 36 miliona ljudi pati od alergije na ambroziju.

Otkriće subpolenskih čestica kao potencijalnog uzroka nastanka teških oblika alergijske astme je pokrenulo seriju novih istraživanja koji su uglavnom fokusirana na antioksidantne osobine i pojedine klase malih molekula prisutnih u subpolenskim česticama (Suphioglu 1998; Schappi, Taylor et al. 1999; Grote, Vrtala et al. 2001; Taylor, Flagan et al. 2002). Subpolenske čestice se oslobadjaju iz zrna polena pri izlaganju vodi i pokazano je da utiču na pogoršavanje simptoma alergije.

Alergije na ambroziju su već godinama u centru istraživanja mnogih istraživačkih grupa i većina alergena je komercijalno dostupna. Svi alergeni ambrozije imaju izoforme, što dalje komplikuje analizu i otežava pripremu komercijalnih imunoterapijskih preparata. Glavni alergen ambrozije Amb a 1 se sastoji od više od 10 izoformi

Cilj rada je sticanje novih saznanja o sastavu alergena u polenu i subpolenskim česticama polena ambrozije, kao i rasvetljavanje uloge pojedinačnih izoformi alergena koji se mogu pronaći u polenu ambrozije. Poredjene proteoma polena i subpolenskih čestica može doprineti daljim saznanjima o uzrocima alergijske astme i razvoju novih imunoterapijskih opcija.

### 5.1.2 Materijal i metode

#### 5.1.2.1 Uzorci polena

Polen *A. artemisiifolia* je dobijen od Instituta za imunologiju i virologiju „Torlak“ iz Beograda. Polen je prikupljen u južnoj Srbiji tokom sezone polinacije 2013 i 2014.

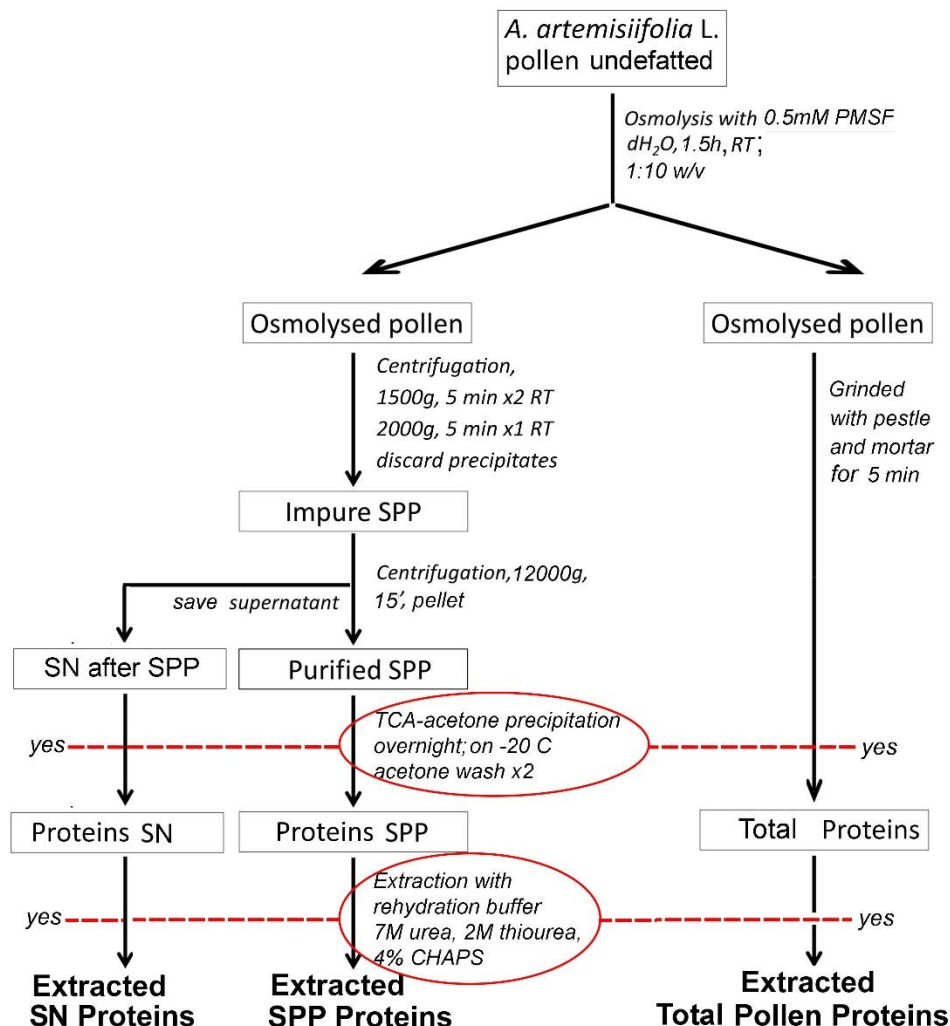
### 5.1.2.2 *Reagensi i standardi*

Fenilmetansulfonil fluorid je nabavljen od Fluke (Fluka, St Galen, Švajcarska). Ditiotritol, jodoacetamid i acetonitril su nabavljeni od Sigma. Korišćena je voda HPLC čistoće (otpornost: 18 mΩ) proizvedena na Smart2Pure3 sistemu za prečišćavanje vode (ThermoFisher Scientific, MA, USA).

### 5.1.2.3 *Ekstrakcija proteina polena i subpolenskih čestica*

Polen *Ambrosia artemisiifolia* pollen (1g) je osmolizovan u 10mL destilovane vode u prisustvu 0.5 mM PMSF tokom 90 minuta na sobnoj temperaturi. Polen je mleven u porcelanskom avanu i proteini su precipitarani sa 4 zapremine ledenom acetona koji je sadržao 10% TCA i 25 mM DTT. Smeša je ostavljena na -20°C preko noći. Čvrsti ostatak je ispiran tri puta čistim ledenim acetonom i sušena na sobnoj temperaturi tokom 2 sata. Proteini su direktno resolubilizovani u rehidracioni pufer (7M Urea, 2M tiourea, 4% Chaps) tokom jednom sata.

Subpolenske čestice su izolovane modifikovanom metodom po Bacsi et al . Nakon suspenzije polena u vodi (1g u 10mL destilovane vode) i osmolize tokom 2 sata intaktna zrna polena i fragmenata polena su otklonjeni iz suspenzije centrifugiranjem niskog intenziteta (1600g tokom 5 min). Ovaj korak je ponovljen dva puta i nastale subpolenske čestice su prikupljene centrifugiranjem na 12000g tokom 15 minuta. Ovaj preparat je dalje prečišćen prema aceton/TCA protokolu, osušen i resolubilizovan u rehidracionom puferu. Sadržaj proteina je meren metodom po Bradfordu. Shema ekstrakcije je data ispod (Slika 16)



**Slika 16. Shema ekstrakcije: ekstrakt ambrozije je pripremljen od 1g komercijalnog odmašćenog polena (Allergon AB, Ångelholm, Sweden) sa 3X 10mL heksana, nakon čega su proteini ekstrahovani suspendovanjem 150mL polena u 1mL destilovane vode i mešanjem na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta. Nakon centrifugiranja na 12000g tokom 15 minuta supernatant je prikupljen i skladišten na  $-20^{\circ}\text{C}$  do upotrebe**

#### 5.1.2.4 Dvodimenzionalna elektroforeza

Prva dimenzija (izoelektrofokusanje) je izvedeno na Ettan IPGphor 3 IEF sistemu (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Imobilisani pH gradijenti (Immobiline DryStrip gel, pH 3-10 NL, 13 cm, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) su aktivno rehidratirani ekstraktima proteina. Za svaki uzorak 125  $\mu\text{g}$  ekstrakta proteina je razblaženo do 250  $\mu\text{L}$  rehidratacionim puferom koji je sadržao 7M ureu, 2M tioureu, 4% CHAPS, 12.5  $\mu\text{L}$  1M DTT, 1.25  $\mu\text{L}$  IPG amfolita, kao i malu količinu bromfenol plavog, nakon čega je uzorak nanet u odgovarajući držač sa IPG trakom, pokriven mineralnim uljem i izložen voltaži od 20V tokom 14 sati. Fokusanje je izvedeno kroz seriju koraka rastuće voltaže (100V tokom 1h; 250V 0:30h; 300V 0:30h; 500V 1h; gradijent 500-



1000V 1h; gradijent 1000-4000 1:30h; 8000V 2h; 8000V 1h), uz ukupno 25655 Vh po traci. Maksimalna vrednost struje je podešena na 50 $\mu$ A po traci. Nakon prve dimenzije IPG trake su ekvilibrisane u 6 mL 50 mM TRIS-HCl pufera, pH 8.8, koji je sadržavao 6 M urea, 30% v/v glicerola, 2% SDS i 64mM DTT tokom 10 minuta, nakon čega je ekvilibrisan u puferu istog sastava koji umesto DTT sadrži 135mM jodoacetamid.

Nakon toga, proteini su razdvajani na osnovu molekulske težine na 12% SDS-PAGE gelovima uz korišćenje Hoefer SE600 jedinice za elektroforezu (Amersham Biosciences). Gelovi su bojeni Coomassie Brilliant Blue bojom, po modifikovanom protokolu prema Candiano et al (Candiano, Bruschi et al. 2004) . Molekulske težine su određene uz korišćenje markera molekulske mase raspona 10-250kDa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### ***5.1.2.5 Kvantifikacija proteina sa 2D gelova Image Platinum 7.0 programskim paketom***

Obojeni gelovi sa 2DE su skenirani korišćenjem Typhoon FLA 7000 sistema za vizualizaciju gelova (GE healthcare, Piscataway, NJ). Detekcija tačaka, sparivanje i kvantifikacija proteina su izvedeni korišćenjem softverskog paketa Image Master 2D Platinum software v7.0 (GE Healthcare). Za analizu slika su poredjeni duplikati sva tri uzorka (TOT; SPP; STD). Proteinske tačke koje su se značajno razlikovale izmedju gelova su podvrgnute MS analizi.

#### ***5.1.2.6 In solution digestija i analiza masenom spektrometrijom***

Uzorci su pripremani za analizu "shotgun proteomics" pristupom po protokolima za 2D elektroforezu (sekcija 6.1.2.3.). Nakon resolubilizacije u rehidratacionom puferu, uzorci su obradjeni prema (Borner and Fielding 2014) et al. Peptidi su analizirani na EASY nLC II sistemu povezanom sa LTQ Orbitrap XL masenim spektrometrom (Thermo scientific Inc., MA, USA). Analizirano je 250ng proteina/uzorku. Razdvajanje je vršeno na EASY-Spray PepMap C18 koloni (150x0.075 mm, veličina čestice 3  $\mu$ m), koristeći linearan gradijent 5-95%B tokom 70 minuta (A = 0.1% mravlja kiselina u vodi, B = 0.1% mravlja kiselina u 98% acetonitrilu), uz protok od 300nL/min. with flow rate 300 nL/min. Injection volume of sample was 2  $\mu$ L. Voltaža spreja je bila podešena na 3kV, voltaža kapilare na 6V, i temperatura na 250°C.

Podaci su prikupljeni uz korišćenje softverskog paketa Xcalibur 2.1 program (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Analiza masenih podataka je izvedena pretraživačima SEQUEST i AMANDA, u sklopu programskog okruženja Proteome Discoverer 1.3.0339 (Thermo Scientific). Korišćeni su sledeći uslovi pretrage: propuštena isecanja - 3; greška mase peptida  $\pm$ 10 ppm; greška detekcije MS/MS  $\pm$ 0.5 Da. Pretrage su sprovedjene

naspram filtrirane baze sekvenci pripadnika Asteracea, izvedene iz Uniprot baze podataka, izdanje 7/2015. Pozitivne identifikacije peptida su bazirane na detekciji makar jednog peptida visoke pouzdanosti, kao i vrednost jonskog skora iznad vrednosti FDR.

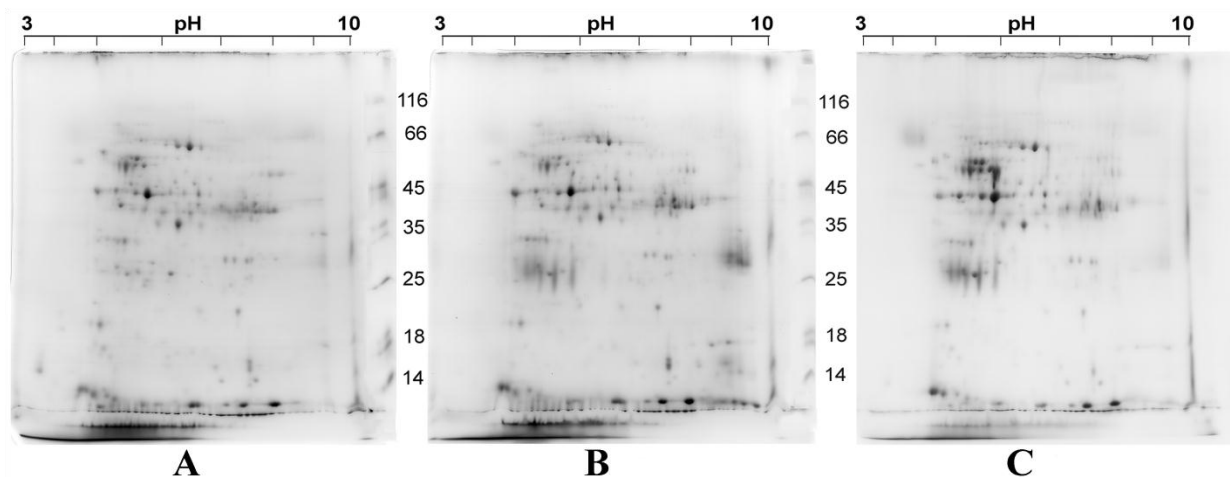
#### 5.1.2.7 Statističko tumačenje

Podaci su prikazani u formatu **srednja vrednost ± standardna devijacija** rezultata dobijenih iz tri eksperimenta. Podaci su analizirani Graph Prism 5 programskim paketom (La Jolla, CA, USA). Razlike između grupa su testirane jednosmernom ANOVA analizom, ili Studentovim t-testom. Razlike su smatrane statistički značajne na nivou značajnosti od  $p < 0.05$ .

### 5.1.3 Rezultati i diskusija

#### 5.1.3.1 2D elektroforeza i kvantifikacija proteina

2D mape ekstrakata totalnog ekstrakta ambrozije, ekstrakta subpolenskih čestica i standardnog ekstrakta su prikazane na slici



**Slika 17. 2D mape ukupnog ekstrakta polena ambrozije (A), ekstrakta subpolenskih čestica (B) i standardnog ekstrakta ambrozije**

Poredjenjem 2D mapa, ukupno 285 tačaka je identifikovano u gelu na kom je analiziran totalni proteinski sadržaj polena ambrozije, dok je na gelu sa subpolenskim česticama identifikovano 327 tačaka. Kvantifikacija i obrada slika gelova je pokazala uočljive razlike u sastavu proteina na gelu. Ukupno je kvantifikovano i odredjen je odnos 162 proteina.

Tabela 10 prikazuje prvih 10 podudarnih tačaka proteina sa gelova na kojim je analiziran ukupni, odnosno subpolenski sastav ekstrakta. Utvrđeno je da su u analiziranim uzorcima TOT

i SPP prisutna 44 proteina čija se koncentracija značajno razlikuje (27% podudarnih tačaka). Dalja analiza je vršena "shotgun" proteomikom.

ID podudaranja	Uzorak	ID tačke	Intenzitet	Površina	Zapremina	Relativni odnos(%) (SPP/TOT)*100
1	SPP	321	5153.1	5.51	10310.5	145.647
	TOT	280	3799.59	4.6975	7079.1	
2	SPP	320	4268.05	1.4775	2559.6	<b>17.12393</b>
	TOT	279	5157.68	7.4775	14947.5	
3	TOT	277	3685.15	1.7525	2598.67	87.82108
	SPP	319	3563.07	1.5325	2282.18	
4	TOT	276	4547.3	4.0475	8054.78	69.96645
	SPP	318	3521.87	3.7925	6563.35	
5	TOT	275	7635.8	4.23	9380.71	71.96897
	SPP	317	4060.53	3.7475	6751.2	
6	TOT	274	5789.42	4.3725	11612.7	53.74435
	SPP	316	3611.9	3.61	6241.17	
7	TOT	273	6906.4	10.56	29662.5	64.77337
	SPP	313	6727.87	7.8375	19213.4	
8	SPP	312	4004.07	5.49	8631.95	70.14904
	TOT	272	3495.93	4.405	6055.23	
9	SPP	311	4669.38	1.6675	2031.4	<b>24.63163</b>
	TOT	267	3209.05	5.3425	8247.12	
10	SPP	310	4126.14	5.4075	9558.21	<b>881.2578</b>
	TOT	270	2542.22	0.9	1084.61	

**Tabela 10. Prikaz poklopljenih parova proteina sa TOT i SPP gelova. Razlika se smatra značajnom kada je razlika u intenzitetu tačke manja ili veća za 50% od kontrolnog sparenog uzorka. Prikazani su samo proteini sa najvišim skorom. Kurzivom su označeni proteini kod kojih je razlika u izračunatoj zapremini tačke veća od 50% (TOT – ukupni ekstrakt proteina polena, SPP ekstrakt subpolenskih čestica)**

### 5.1.3.2 Subproteomi polena i subpolenskih čestica određeni primenom "shotgun" proteomike

Primena naprednih tehnika nove generacije omogućava dobijanje ogromne količine informacija iz kompleksnih uzoraka. Rezultati prikazani u Tabelama 11, 12 i 13 ukazuju da se proteinski sastav ekstrakta polena ambrozije, subpolenskih čestica i standardnog odmašćenog polena koji se koristi u dijagnostici značajno razlikuju.

Tabele prikazuju proteine identifikovane sa najvećim SEQUEST skorom u analiziranom uzorku.

Pristupni broj	Protein	Pokrivenost sekvence(%)
O04004	Non-specific lipid-transfer protein	46,61
P02878	Pollen allergen Amb a 5 OS=Ambrosia artemisiifolia var. artemisiifolia	93,33
D4IIH3	Ragweed homologue of Art v 1 (Fragment) OS=Ambrosia artemisiifolia	75,82
E1XUL4	Putative pectate lyase OS=Ambrosia artemisiifolia GN=amba1.3	61,46
P43174	Pollen allergen Amb p 5a OS=Ambrosia psilostachya	71,43
P00304	Pollen allergen Amb a 3 OS=Ambrosia artemisiifolia var. artemisiifolia	53,47
E1XUL3	Putative pectate lyase OS=Ambrosia artemisiifolia GN=amba1.2	58,04
Q9ZT67	Resistance protein candidate RGC20 (Fragment) OS=Lactuca sativa	28,84
G0Z5X7	Ubiquitin OS=Carthamus tinctorius	71,92
P93666	Leucine-rich-repeat protein OS=Helianthus annuus	32,59

**Tabela 11. Standardni ekstrakt**

Pristupni broj	Protein	Pokrivenost sekvence
E1XUL3	Putative pectate lyase OS=Ambrosia artemisiifolia GN=amba1.2	91,96
P27760	Pollen allergen Amb a 1.2 OS=Ambrosia artemisiifolia	91,96
D4IIH3	Ragweed homologue of Art v 1 (Fragment) OS=Ambrosia artemisiifolia	92,31
D4IIH1	Ragweed homologue of Art v 1 (Fragment) OS=Ambrosia artemisiifolia	44,29
D4IIH6	Ragweed homologue of Art v 1 OS=Ambrosia artemisiifolia	56,03
E1XUL4	Putative pectate lyase OS=Ambrosia artemisiifolia GN=amba1.3	69,77
O04004	Non-specific lipid-transfer protein OS=Ambrosia artemisiifolia	49,15
D2IH11	Acetoacetyl-CoA thiolase OS=Helianthus annuus	20,68
Q6S4N3	Cytochrome c OS=Helianthus annuus	70,54
P02878	Pollen allergen Amb a 5 OS=Ambrosia artemisiifolia var. artemisiifolia	88,89

**Tabela 12. Proteini subpolenskih čestica**

Pristupni broj	Protein	Pokrivenost sekvence
Q2KN24	Profilin OS=Ambrosia artemisiifolia	72,18
Q2KN23	Profilin OS=Ambrosia artemisiifolia	70,68
G8XWY8	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase OS=Mikania micrantha	51,91
E1XUL4	Putative pectate lyase OS=Ambrosia artemisiifolia GN=amba1.3	73,80
E0D6S1	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase OS=Gynura bicolor	60,88
E1XUL3	Putative pectate lyase OS=Ambrosia artemisiifolia GN=amba1.2 P	73,12
H6VXA0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunit 1 (Fragment) OS=Rudbeckia hirta	56,44
P27760	Pollen allergen Amb a 1.2 OS=Ambrosia artemisiifolia	73,12
A5HSG4	Putative calmodulin OS=Artemisia annua	79,87
F6KNQ6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Tagetes patula	85,38

**Tabela 13. Proteini ukupnog ekstrakta polena A. artemisiifolia**

Bez obzira što naš pristup nije dao apsolutnu kvantifikaciju različitih alergena u tri preparata ekstrakta polena Amb, uvidom u 2D PAGE mape i proteine identifikovane metodom „shotgun“ proteomike, evidentno je da postoje velike razlike u sastavu ovih frakcija.

Vodeni ekstrakt je bogat nsLTP-om, kao i alergenom Amb a 5. Subpolenske čestice kao najzastupljenije proteine imaju homologe Art v 1 (Amb a 4 alergen), dok je ukupni ekstrakt polena bogat profilinima.

Ovi rezultati su od fundamentalnog i praktičnog značaja, jer mogu da unaprede dijagnostiku alergijskih oboljenja, kao i da objasne efekte subpolenskih čestica na razvoj alergijskih oboljenja.

## 6 Zaključci

Svi ciljevi postavljeni u ovoj tezi su ostvareni. Razvijene su metode za analizu fenolnih jedinjenja alergeno važnih izvora: ekstrakta polena *Ambrosia artemisiifolia*, kao i hrane koja izaziva alergijske reakcije (u prvom redu kikirikija i ekstrakt jabuke). Ove metode su primenjene u analizi fenolnih jedinjenja koja imaju anti-alergijsko dejstvo, kao i potencijalno hipoalergenih preparata ukršteno-povezanih alergena kikirikija.

Naši rezultati pokazuju da subpolenske čestice poseduju veći sadržaj glikozilovanih polifenola u odnosu na ukupan ekstrakt polena i da u polenskim ekstraktima ima jedinjenja koja mogu da utiču na imuni odgovor. Rezičke postoje i u proteinskom sastavu ekstrakta polena i subpolenskih čestica, što smo i pokazali korišćenjem „proteomics“ pristupa. Proteom polena ambrozije do sada nije detaljno ispitan. Ovaj rad predstavlja nove protokole za ekstrakciju i pripremu uzoraka koji su pogodni za dalju analizu. Takođe su predstavljeni i novi protokoli i rezultati analize proteoma subpolenskih čestica, što je novi metodološki pristup koji do sada nije primenjivan u analizi ovog biljnog materijala.

Analizom fenolnog sastava ekstrakta kikirikija nakon dejstva lakaze, pokazali smo da se fenolni sastav menja. Nakon reakcije polimerizacije dolazi do značajnog pada koncentracije većine detektovanih jedinjenja, uz izuzetak derivata izoramnetina i procijanidina. Naši rezultati pokazuju da proteini kikirikija umreženi lakazama poseduju alergena i imunološka svojstva slična polaznom materijalu. Umrežavanje pokazuje umeren efekat na biodostupnost glavnih alergena u model sistemu Caco-2 ćelija, menja tercijarnu strukturu alergena, ali ne utiče na vezivanje humanog IgE i aktivaciju bazofila. Uklanjanje polifenola može pozitivno da utiče na transport glavnih alergena od strane enterocita, ali nema efekta na alergena svojstva.

## 7 Reference

- Ainsworth, E. A. and K. M. Gillespie (2007). "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent." Nat Protoc 2(4): 875-877.
- Akiyama, H., Y. Sato, et al. (2005). "Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models." FEBS Lett 579(20): 4485-4491.
- Al-Ahmed, N., S. Alsowaidi, et al. (2008). "Peanut allergy: an overview." Allergy Asthma Clin Immunol 4(4): 139-143.
- Aldini, G., M. Orioli, et al. (2011). "Protein modification by acrolein: relevance to pathological conditions and inhibition by aldehyde sequestering agents." Mol Nutr Food Res 55(9): 1301-1319.
- Appeldoorn, M. M., J. P. Vincken, et al. (2009). "Combined normal-phase and reversed-phase liquid chromatography/ESI-MS as a tool to determine the molecular diversity of A-type procyanidins in peanut skins." J Agric Food Chem 57(14): 6007-6013.
- Bacsi, A., B. K. Choudhury, et al. (2006). "Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases." J Allergy Clin Immunol 118(4): 844-850.
- Bagarozzi, D. A., Jr. and J. Travis (1998). "Ragweed pollen proteolytic enzymes: possible roles in allergies and asthma." Phytochemistry 47(4): 593-598.
- Bassard, J.-E., P. Ullmann, et al. (2010). "Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism." Phytochemistry 71(16): 1808-1824.
- Berin, M. C. and H. A. Sampson (2013). "Mucosal immunology of food allergy." Curr Biol 23(9): R389-400.
- Bernard, A., S. Carbonnelle, et al. (2003). "Lung hyperpermeability and asthma prevalence in schoolchildren: unexpected associations with the attendance at indoor chlorinated swimming pools." Occup Environ Med 60(6): 385-394.
- Blanc, F., K. Adel-Patient, et al. (2009). "Capacity of purified peanut allergens to induce degranulation in a functional in vitro assay: Ara h 2 and Ara h 6 are the most efficient elicitors." Clinical and Experimental Allergy 39(8): 1277-1285.
- Boldogh, I., A. Bacsi, et al. (2005). "ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation." J Clin Invest 115(8): 2169-2179.
- Borner, G. H. and A. B. Fielding (2014). "Using in-solution digestion, peptide fractionation, and a Q exactive mass spectrometer to analyze the proteome of clathrin-coated vesicles." Cold Spring Harbor Protocols 2014(11): 1192-1195.
- Buchert, J., D. Ercili Cura, et al. (2010). "Crosslinking food proteins for improved functionality." Annu Rev Food Sci Technol 1: 113-138.
- Bueb, J. L., M. Mousli, et al. (1991). "Molecular basis for cellular effects of naturally occurring polyamines." Agents and Actions 33(1-2): 84-87.
- Burks, A. W. (2008). "Peanut allergy." Lancet 371(9623): 1538-1546.
- Cabanillas, B., C. Cuadrado, et al. (2015). "Potential changes in the allergenicity of three forms of peanut after thermal processing." Food Chem 183: 18-25.
- Candiano, G., M. Bruschi, et al. (2004). "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis." Electrophoresis 25(9): 1327-1333.

- Chandrasekara, N. and F. Shahidi (2011). "Effect of roasting on phenolic content and antioxidant activities of whole cashew nuts, kernels, and testa." J Agric Food Chem 59(9): 5006-5014.
- Chen, Q., J. Zhao, et al. (2009). "Study on discrimination of Roast green tea (*Camellia sinensis* L.) according to geographical origin by FT-NIR spectroscopy and supervised pattern recognition." Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy 72(4): 845-850.
- Chung, S. Y., Y. Kato, et al. (2005). "Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens." J Sci Food Agric 85(15): 2631-2637.
- Clare, D. A., G. Gharst, et al. (2008). "Effects of transglutaminase catalysis on the functional and immunoglobulin binding properties of peanut flour dispersions containing casein." J Agric Food Chem 56(22): 10913-10921.
- Clare, D. A., G. Gharst, et al. (2007). "Transglutaminase polymerization of peanut proteins." J Agric Food Chem 55(2): 432-438.
- De Swert, L. F. (1999). "Risk factors for allergy." Eur J Pediatr 158(2): 89-94.
- Dharajiya, N., I. Boldogh, et al. (2008). "Role of pollen NAD(P)H oxidase in allergic inflammation." Curr Opin Allergy Clin Immunol 8(1): 57-62.
- Fabre, N., I. Rustan, et al. (2001). "Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom 12(6): 707-715.
- Falasca, G., M. Franceschetti, et al. (2010). "Polyamine biosynthesis and control of the development of functional pollen in kiwifruit." Plant Physiol Biochem 48(7): 565-573.
- FAO/WHO. (2001). "Evaluation of allergenicity of genetically modified foods." Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome,).
- Feroli, M. E., L. Pirona, et al. (2000). "Prolactin and polyamine catabolism: specific effect on polyamine oxidase activity in rat thymus." Mol Cell Endocrinol 165(1-2): 51-56.
- Ferreres, F., A. P. Oliveira, et al. (2014). "Piper betle Leaves: Profiling Phenolic Compounds by HPLC/DAD-ESI/MS and Anti-cholinesterase Activity." Phytochem Anal.
- Folkerts, G., G. Walzl, et al. (2000). "Do common childhood infections 'teach' the immune system not to be allergic?" Immunol Today 21(3): 118-120.
- Franova, S., G. Nosalova, et al. (2007). "Red wine polyphenolic compounds inhibit tracheal smooth muscle contraction during allergen-induced hyperreactivity of the airways." J Pharm Pharmacol 59(5): 727-732.
- Frenz, D. A., M. A. Palmer, et al. (1995). "Seasonal characteristics of ragweed pollen dispersal in the United States." Ann Allergy Asthma Immunol 75(5): 417-422.
- Galli, S. J., S. Nakae, et al. (2005). "Mast cells in the development of adaptive immune responses." Nat Immunol 6(2): 135-142.
- Gomes, A., E. Fernandes, et al. (2008). "Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids." Curr Med Chem 15(16): 1586-1605.
- Gong, J. and S. S. Chen (2003). "Polyphenolic antioxidants inhibit peptide presentation by antigen-presenting cells." Int Immunopharmacol 3(13-14): 1841-1852.



- González Romano, M. L., M. T. Gallego, et al. (1996). "Extraordinary stability of IgE-binding Parietaria pollen allergens in relation to chemically bound flavonoids." Molecular Immunology 33(17-18): 1287-1293.
- Grote, M., S. Vrtala, et al. (2001). "Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy." J Allergy Clin Immunol 108(1): 109-115.
- Guarner, F., R. Bourdet-Sicard, et al. (2006). "Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 3(5): 275-284.
- Ha, H. C., J. D. Yager, et al. (1998). "Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species." Biochem Biophys Res Commun 244(1): 298-303.
- Hartree, E. F. (1972). "Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response." Anal Biochem 48(2): 422-427.
- Hendrich, A. B. (2006). "Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds." Acta Pharmacol Sin 27(1): 27-40.
- Hoet, P. H. and B. Nemery (2000). "Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278(3): L417-433.
- Hu, X., J. Ren, et al. (2011). "Emulsifying properties of the transglutaminase-treated crosslinked product between peanut protein and fish (*Decapterus maruadsi*) protein hydrolysates." Journal of the Science of Food and Agriculture 91(3): 578-585.
- Huang, L. L., C. Pan, et al. (2015). "Protective effects of grape seed proanthocyanidins on cardiovascular remodeling in DOCA-salt hypertension rats." J Nutr Biochem 26(8): 841-849.
- Huber, G. M. and H. P. Rupasinghe (2009). "Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts." Journal of Food Science 74(9): C693-700.
- Igarashi, K. and K. Kashiwagi (2010). "Modulation of cellular function by polyamines." Int J Biochem Cell Biol 42(1): 39-51.
- Javanmardi, J., A. Khalighi, et al. (2002). "Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran." J Agric Food Chem 50(21): 5878-5883.
- Jung, M., S. Triebel, et al. (2009). "Influence of apple polyphenols on inflammatory gene expression." Mol Nutr Food Res 53(10): 1263-1280.
- Kalinowska, M., A. Bielawska, et al. (2014). "Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties." Plant Physiol Biochem 84: 169-188.
- Kandere-Grzybowska, K., D. Kempuraj, et al. (2006). "Regulation of IL-1-induced selective IL-6 release from human mast cells and inhibition by quercetin." Br J Pharmacol 148(2): 208-215.
- Karhunen, E., M. L. Niku-Paavola, et al. (1990). "A novel combination of prosthetic groups in a fungal laccase; PQQ and two copper atoms." FEBS Lett 267(1): 6-8.
- Kikuzaki, H., M. Hisamoto, et al. (2002). "Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds." J Agric Food Chem 50(7): 2161-2168.
- King, T. P. (1976). "Chemical and biological properties of some atopic allergens." Adv Immunol 23: 77-105.

- Kite, G. C., S. Larsson, et al. (2013). "Acyl spermidines in inflorescence extracts of elder (*Sambucus nigra* L., Adoxaceae) and elderflower drinks." J Agric Food Chem 61(14): 3501-3508.
- Kobayashi, S. and J. Watanabe (2003). "Inhibitory activities of aromatic amino acid esters and peptides against ovalbumin permeation through Caco-2 cell monolayers." Biosci Biotechnol Biochem 67(11): 2498-2500.
- Koistinen, K. M., P. Soininen, et al. (2005). "Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands." Phytochemistry 66(21): 2524-2533.
- Koppelman, S. J., R. A. Vlooswijk, et al. (2001). "Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world." Allergy 56(2): 132-137.
- Kroghsbo, S., N. M. Rigby, et al. (2014). "Assessment of the sensitizing potential of processed peanut proteins in Brown Norway rats: roasting does not enhance allergenicity." Plos One 9(5): e96475.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Laemmli, U. K. and S. F. Quittner (1974). "Maturation of the head of bacteriophage T4. IV. The proteins of the core of the tubular polyheads and in vitro cleavage of the head proteins." Virology 62(2): 483-499.
- Larbat, R., K. M. Olsen, et al. (2012). "Influence of repeated short-term nitrogen limitations on leaf phenolics metabolism in tomato." Phytochemistry 77: 119-128.
- Lee, J. D., J. E. Huh, et al. (2009). "Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and in vivo models." International Immunopharmacology 9(3): 268-276.
- Ma, Y., A. Kosinska-Cagnazzo, et al. (2014). "Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanched peanut skins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry." J Chromatogr A 1356: 64-81.
- Maksimović, Z. (2008). "In vitro antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb." Industrial Crops and Products 28(3): 356-360.
- Manach, C., A. Mazur, et al. (2005). "Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases." Current Opinion in Lipidology 16(1): 77-84.
- March, R. E., E. G. Lewars, et al. (2006). "A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry." International Journal of Mass Spectrometry 248(1-2): 61-85.
- Martinez-Sanchez, A., A. Gil-Izquierdo, et al. (2008). "A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species." J Agric Food Chem 56(7): 2330-2340.
- Mattinen, M. L., M. Hellman, et al. (2006). "Effect of protein structure on laccase-catalyzed protein oligomerization." J Agric Food Chem 54(23): 8883-8890.
- Mattinen, M. L., K. Kruus, et al. (2005). "Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides." FEBS J 272(14): 3640-3650.
- May, S. W. (1999). "Applications of oxidoreductases." Curr Opin Biotechnol 10(4): 370-375.
- McCarthy, A. L., Y. C. O'Callaghan, et al. (2014). "Phenolic-enriched fractions from brewers' spent grain possess cellular antioxidant and immunomodulatory effects in cell culture model systems." Journal of the Science of Food and Agriculture 94(7): 1373-1379.

- Middleton, E., Jr. (1986). "Effect of flavonoids on basophil histamine release and other secretory systems." Prog Clin Biol Res 213: 493-506.
- Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." Pharmacological Reviews 52(4): 673-751.
- Mihajlovic, L., J. Radosavljevic, et al. (2015). "Composition of polyphenol and polyamide compounds in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen and sub-pollen particles." Phytochemistry 109: 125-132.
- Moffatt, M. F., M. R. Hill, et al. (1994). "Genetic linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses." Lancet 343(8913): 1597-1600.
- Moreno, F. J., L. A. Rubio, et al. (2006). "Uptake of 2S albumin allergens, Ber e 1 and Ses i 1, across human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers." J Agric Food Chem 54(22): 8631-8639.
- Nagata, M. (2005). "[The current status and an overview of immunotherapy using allergens]." Nippon Naika Gakkai Zasshi 94(1): 152-156.
- Negri, G., E. W. Teixeira, et al. (2011). "Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from Southeast Brazil." J Agric Food Chem 59(10): 5516-5522.
- Norman, P. S. (1980). "An overview of immunotherapy: implications for the future." J Allergy Clin Immunol 65(2): 87-96.
- Ortolani, C., M. Ispano, et al. (2001). "Introducing chemists to food allergy." Allergy 56 Suppl 67: 5-8.
- Penarrieta, J. M., J. A. Alvarado, et al. (2008). "Total antioxidant capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds in canihua (*Chenopodium pallidicaule*): an Andean pseudocereal." Mol Nutr Food Res 52(6): 708-717.
- Perrier, C. and B. Corthesy (2011). "Gut permeability and food allergies." Clin Exp Allergy 41(1): 20-28.
- Peternel, R., S. Music Milanovic, et al. (2008). "Airborne ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen content in the city of Zagreb and implications on pollen allergy." Ann Agric Environ Med 15(1): 125-130.
- Platts-Mills, T. A. and M. D. Chapman (1987). "Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control." J Allergy Clin Immunol 80(6): 755-775.
- Quirantes-Pine, R., J. Lozano-Sanchez, et al. (2013). "HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts." Phytochem Anal 24(3): 213-223.
- Radosavljevic, J., E. Nordlund, et al. (2014). "Sensitizing potential of enzymatically cross-linked peanut proteins in a mouse model of peanut allergy." Mol Nutr Food Res 58(3): 635-646.
- Rastogi, S. S. and R. B. Singh (2001). "Antioxidants, free radical stress and diabetes." Adv Exp Med Biol 498: 201-211.
- Re, R., N. Pellegrini, et al. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." Free Radic Biol Med 26(9-10): 1231-1237.
- Reddy, N., Q. Jiang, et al. (2012). "Preparation and properties of peanut protein films crosslinked with citric acid." Industrial Crops and Products 39(1): 26-30.
- Rook, G. A. and L. R. Brunet (2005). "Old friends for breakfast." Clin Exp Allergy 35(7): 841-842.
- Schappi, G. F., P. E. Taylor, et al. (1999). "Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1." Allergy 54(5): 478-483.
- Schmitt, D. A., H. Cheng, et al. (2004). "Competitive inhibition ELISA for quantification of Ara h 1 and Ara h 2, the major allergens of peanuts." J AOAC Int 87(6): 1492-1497.

- Schulten, V., I. Lauer, et al. (2011). "A food matrix reduces digestion and absorption of food allergens in vivo." Mol Nutr Food Res 55(10): 1484-1491.
- Sekhon-Loodu, S., Z. Ziaullah, et al. (2015). "Novel quercetin-3-O-glucoside eicosapentaenoic acid ester ameliorates inflammation and hyperlipidemia." Inflammopharmacology 23(4): 173-185.
- Selinheimo, E., K. Autio, et al. (2007). "Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making." J Agric Food Chem 55(15): 6357-6365.
- Shahidi, F. and Y. Zhong (2008). "Bioactive peptides." Journal of AOAC International 91(4): 914-931.
- Shahidi, F. and Y. Zhong (2011). "Revisiting the polar paradox theory: a critical overview." J Agric Food Chem 59(8): 3499-3504.
- Silva, J. P., A. C. Gomes, et al. (2008). "Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells." Eur J Pharmacol 601(1-3): 50-60.
- Singh, H. (1991). "Modification of food proteins by covalent crosslinking." Trends Food Sci Tech 2(C): 196-200.
- Sklorz, M., J. J. Briede, et al. (2007). "Concentration of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygen free radical formation from urban particulate matter." J Toxicol Environ Health A 70(21): 1866-1869.
- Sobolev, V. S. and R. J. Cole (1999). "trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products." J Agric Food Chem 47(4): 1435-1439.
- Sobolev, V. S., S. T. Deyrup, et al. (2006). "New peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexin with prenylated benzenoid and but-2-enolide moieties." J Agric Food Chem 54(6): 2111-2115.
- Sobolev, V. S., B. W. Horn, et al. (2006). "Production of stilbenoids and phenolic acids by the peanut plant at early stages of growth." J Agric Food Chem 54(10): 3505-3511.
- Sobolev, V. S., A. A. Sy, et al. (2008). "Spermidine and flavonoid conjugates from peanut (*Arachis hypogaea*) flowers." J Agric Food Chem 56(9): 2960-2969.
- Solomon, E. I., U. M. Sundaram, et al. (1996). "Multicopper Oxidases and Oxygenases." Chem Rev 96(7): 2563-2606.
- Starkl, P., D. Krishnamurthy, et al. (2011). "Heating Affects Structure, Enterocyte Adsorption and Signalling, As Well as Immunogenicity of the Peanut Allergen Ara h 2." Open Allergy J 4: 24-34.
- Stefanescu, M., C. Matache, et al. (2001). "Pycnogenol efficacy in the treatment of systemic lupus erythematosus patients." Phytother Res 15(8): 698-704.
- Stojadinovic, M., R. Pieters, et al. (2014). "Cross-Linking of beta-Lactoglobulin Enhances Allergic Sensitization Through Changes in Cellular Uptake and Processing." Toxicol Sci.
- Stojadinovic, M., J. Radosavljevic, et al. (2013). "Binding affinity between dietary polyphenols and beta-lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed." Food Chem 136(3-4): 1263-1271.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." BMJ 299(6710): 1259-1260.
- Suphioglu, C. (1998). "Thunderstorm asthma due to grass pollen." Int Arch Allergy Immunol 116(4): 253-260.
- Taksey, J. and T. J. Craig (2001). "Allergy test results of a rural and small-city population compared with those of an urban population." J Am Osteopath Assoc 101(5 Suppl): S4-7.
- Taylor, P. E., R. C. Flagan, et al. (2002). "Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma." J Allergy Clin Immunol 109(1): 51-56.

- Untersmayr, E., S. C. Diesner, et al. (2010). "Nitration of the egg-allergen ovalbumin enhances protein allergenicity but reduces the risk for oral sensitization in a murine model of food allergy." *Plos One* 5(12): e14210.
- van Esch, B. C., M. Gros-van Hest, et al. (2013). "Sensitizing capacity and allergenicity of enzymatically cross-linked sodium caseinate in comparison to sodium caseinate in a mouse model for cow's milk allergy." *Toxicol Lett* 218(1): 50-55.
- Veeriah, S., C. Miene, et al. (2008). "Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells." *Int J Cancer* 122(12): 2647-2655.
- Vukics, V. and A. Guttman (2010). "Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry." *Mass Spectrometry Reviews* 29(1): 1-16.
- Warren, C. M., P. R. Krzesinski, et al. (2003). "Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins." *Electrophoresis* 24(11): 1695-1702.
- Xu, F. (1996). "Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition." *Biochemistry* 35(23): 7608-7614.
- Yoon, M. S., J. S. Lee, et al. (2006). "Apigenin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: Implication of immunotherapeutic adjuvant." *Mol Pharmacol* 70(3): 1033-1044.
- Yu, J., M. Ahmedna, et al. (2011). "Enzymatic treatment of peanut kernels to reduce allergen levels." *Food Chem* 127(3): 1014-1022.
- Zhu, X. X., Y. J. Li, et al. (2013). "Divergent immunomodulatory effects of extracts and phenolic compounds from the fern *Osmunda japonica* Thunb." *Chinese Journal of Integrative Medicine* 19(10): 761-770.

## 8 Biografija

Luka Mihajlović je rođen 1.10.1984. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera završio je u Beogradu. Godine 2003. upisao je Hemijski fakultet, studijska grupa Biohemija. Diplomirao je septembra 2008. godine, sa prosečnom ocenom tokom studija 9,11 i ocenom 10 na diplomskom radu. Iste godine upisao se na poslediplomske studije iz biohemije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Od novembra 2008. godine zaposlen je na Hemijskom fakultetu u Beogradu kao istraživač-saradnik. Luka Mihajlović se stručno usavršavao na institutu VTT u Espu, Finska (dva boravka od po mesec dana), na institutu Karolinska u Stokholmu, Švedska (2 meseca) i u institut INRA u Nantu, Francuska (2 meseca)

Luka Mihajlović je koautor jednog poglavlja u knjizi, 8 naučnih radova i 8 saopštenja.