

ПРИСТУПНА  
ПРЕДАВАЊА  
ДОПИСНИХ ЧЛАНОВА

БЕОГРАД • 2019



1841-2019

*Српска академија наука и уметности*  
*178 година*





ПРИСТУПНА ПРЕДАВАЊА  
ДОПИСНИХ ЧЛАНОВА

Књига I

ISSN 2683-4251

SERBIAN ACADEMY OF SCIENCES AND ARTS

---

PRESIDENCY

# INAUGURAL LECTURES OF THE CORRESPONDING MEMBERS

Volume 1

The volume is published on account of the SASA  
Presidency resolution adopted at its 1<sup>st</sup> session of 28  
February 2019 and the SASA Executive Board resolution  
adopted at its 18<sup>th</sup> session of 19 September 2019

Editor

academician  
MIRO VUKSANOVIĆ

BELGRADE  
2019

СРПСКА АКАДЕМИЈА НАУКА И УМЕТНОСТИ

---

ПРЕДСЕДНИШТВО

**ПРИСТУПНА ПРЕДАВАЊА  
ДОПИСНИХ ЧЛАНОВА**

Књига 1

Књига је објављена на основу одлуке Председништва  
САНУ са I седнице 28. фебруара 2019. и одлуке  
Извршног одбора САНУ са XVIII седнице  
19. септембра 2019. године

Уредник

академик  
МИРО ВУКСАНОВИЋ

БЕОГРАД  
2019

---

---

## SASA PRESIDENCY

academician Vladimir S. Kostić,  
*President of SASA*

academician Zoran V. Popović,  
*Vice President of SASA for Natural Sciences*

academician Ljubomir Maksimović,  
*Vice President of SASA for Social Sciences*

academician Marko Anđelković,  
*Secretary General of SASA*

academician Stevan Pilipović,  
*President of SASA Branch in Novi SAD*

academician Ninoslav Stojadinović,  
*President of SASA Branch in Niš*

academician Gradimir Milovanović,  
*Secretary of the Department of Mathematics,  
Physics and Geo Sciences*

academician Vladimir Stevanović,  
*Secretary of the Department of Chemical  
and Biological Sciences*

academician Zoran Lj. Petrović,  
*Secretary of the Department of Technical Sciences*

academician Dragan Micić,  
*Secretary of the Department of Medical Sciences*

academician Zlata Bojović,  
*Secretary of the Department of Language and Literature*

academician Kosta Čavoški,  
*Secretary of the Department of Social Sciences*

academician Mihailo Vojvodić,  
*Secretary of the Department of Historical Sciences*

academician Milan Lojanica,  
*Secretary of the Department of Fine Arts and Music*

---

---

ПРЕДСЕДНИШТВО САНУ

академик Владимир С. Костић,  
*п̄редседник САНУ*

академик Зоран В. Поповић,  
*п̄ошп̄редседник САНУ за п̄риродне науке*

академик Љубомир Максимовић,  
*п̄ошп̄редседник САНУ за друшп̄вене науке*

академик Марко Анђелковић,  
*п̄енерални секретар САНУ*

академик Стеван Пилиповић,  
*п̄редседник Опранка САНУ у Новом Саду*

академик Нинослав Стојадиновић,  
*п̄редседник Опранка САНУ у Нишу*

академик Градимир Миловановић,  
*секретар Одељења за математичку,  
физику и тео-науке*

академик Владимир Стевановић,  
*секретар Одељења хемијских  
и биолошких наука*

академик Зоран Љ. Петровић  
*секретар Одељења п̄техничких наука*

академик Драган Мицић,  
*секретар Одељења медицинских наука*

академик Злата Бојовић,  
*секретар Одељења језика и књижевности*

академик Коста Чавошки,  
*секретар Одељења друшп̄вених наука*

академик Михаило Војводић,  
*секретар Одељења историјских наука*

академик Милан Лојаница,  
*секретар Одељења ликовне и музичке уметности*



---

Портретне фотографије су из фототеке Библиотеке САНУ.  
Илустрације на корицама и празним страницама књиге  
представљају детаље са фасаде Палате САНУ.

---

---

## САДРЖАЈ

Академик Миро Вуксановић <i>Три књије чланова САНУ</i> .....	15
<b>Одељење за математику, физику и гео-науке</b>	
Дописни члан Жељко Шљиванчанин <i>Компјутерско моделовање наносструктура на површинама кристала</i> .....	27
<b>Одељење хемијских и биолошких наука</b>	
Дописни члан Тања Ћирковић Величковић <i>Дојринос еројеоомике наукама о храни, исхрани и живојној средини: размаирање деградација и модификација хране током обраде и дијетције хране и од утицајем запађења живојне средине</i> .....	51
<b>Одељење техничких наука</b>	
Дописни члан Влада Вељковић <i>Развој и примена вишефазној реактора са вибрационом мешалицом у производњи биодизела</i> .....	81
<b>Одељење медицинских наука</b>	
Дописни члан Татјана Симић <i>Поремећај редокс хомеостазе у хроничној бубрежној слабости</i> .....	109

## Одељење језика и књижевности

- Дописни члан Љубинко Раденковић  
*Источнословенска бојиња Мокош: ишћања  
реконструкције* ..... 131
- Дописни члан Јован Делић  
*Памћење поезије и ујеловљење традиције* ..... 145
- Дописни члан Зоран Пауновић  
*Данило Киш и Џејмс Џојс: случај Уликс* ..... 157

## Одељење друштвених наука

- Дописни члан Павле Петровић  
*Инфлација: оикуд, како се развија  
и како је зауставити?* ..... 173
- Дописни члан Алпар Лошонц  
*Да ли су идеје још релевантне?* ..... 201

## Одељење историјских наука

- Дописни члан Вујадин Иванишевић  
*Методолошки приступ у истраживању новца  
средњовековне Србије* ..... 219
- Дописни члан Драган Војводић  
*Оружје с небеса. Иконологија средњовековних  
представа инвестиције владара  
војним инстанијама* ..... 235
- Дописни члан Мира Радојевић  
*Прејензије Централној комисији  
Комунистичке партије Хрватске  
на Срем (1941–1944)* ..... 259

## Одељење ликовне и музичке уметности

- Дописни члан Сава Халугин  
*Токови вајареве мајме* ..... 279
- Дописни члан Јелена Јовановић  
*Етномузиколошки и уметнички рад у домену  
традиционалној фолклорној вокалној наслеђа* ..... 289

## Радне биографије предавача

- Желько Шљиванчанин ..... 323

---

Тања Ђирковић Величковић .....	327
Влада Вельковић .....	333
Татјана Симић .....	337
Љубинко Раденковић .....	343
Јован Делић .....	347
Зоран Пауновић .....	349
Павле Петровић .....	353
Алпар Лошонц .....	357
Вујадин Иванишевић .....	361
Драган Војводић .....	365
Мира Радојевић .....	369
Сава Халугин .....	371
Јелена Јовановић .....	375







Тања Ћирковић Величковић

*Дојринос прошеомике наукама  
о храни, исхрани и живојној  
средини: размајрање деградација  
и модификација хране током обраде  
и дијесџије хране и њод уџицајем  
зајађења живојне средине*



Предавање одржано на 3. скупу Одељења хемијских и биолошких наука, 24. априла 2019. године.



---

---

## 1. Увод

Примена масене спектрометрије високе резолуције у биохемији значајно је унапредила аналитику протеина и довела до развоја нове високопропусне методе одређивања протеина, протеомике. Основна примена протеомике у области алергијских обољења базира се на традиционалном приступу идентификације протеина који везују имуноглобулин Е исецањем протеина из гела и одређивањем идентитета тандем масеном спектрометријом и претрагом база података. Највећи изазови ове анализе леже у анализи биљних протеома или других протеома за које не постоји довољан број података у биоинформатичким базама података. Модернији приступи анализи укупних протеина узорка методом “shotgun” протеомике данас подразумевају идентификацију пептида насталих фрагментацијом свих протеина у датом узорку. Дигестомика (аналитика пептида насталих фрагментацијом протеина дигестивним ензимима) од посебног је значаја и за разумевање молекуларних основа алергија на храну. И даље је велика непознаница због чега само неки протеини хране изазивају алергијска обољења, а други не. Боље разумевање процеса дигестије и деградације протеина хране помоћи ће бољем разумевању алергија на храну. Наши резултати указују на значај матрикса хране у овом процесу и значај систематичног приступа проучавању процеса дигестије алергена у матриксу хране. Сложене су и још увек недовољно проучене везе које постоје између загађености животне средине, квалитета хране и здравља на молекуларном нивоу. Данас су доступне алатке којима се може детаљно и глобално приступити анализи свих протеинских форми у узорку. Могуће је на нивоу појединачних молекула

утвrdити да су исти били изложени повећаном нивоу стреса који може да буде биолошки оксидативни стрес, услед присуства тешких метала који могу да оксидују аминокиселинске остатке протеина, или под дејством високе температуре која као таква представља стрес за све биомолекуле. Овај приступ може да помери границе нашег знања о везама на молекуларном нивоу између загађености животне средине, квалитета хране и здравља. Боље разумевање ових веза може да помогне у превенцији и заштити здравља људи и животиња, а може и да подигне свест о сложености штетних ефеката загађења животне средине.

## **2. Протеомика за потребе утврђивања протеина који везују имуноглобулин Е и изазивају алергијска обољења**

Примена масене спектрометрије високе резолуције у биохемији значајно је унапредила аналитику протеина, како на великој, тако и на малој скали [1]. Аналитика протеина високе пропусности има и посебан назив – протеомика. Прве студије које су могле да се назову протеомичким студијама објављене су 1975. године [2] и базирале су се на раздвајању протеинске смеше електрофорезом високе резолуције у две димензије (раздвајање протеина по наелектрисању у првој димензији, а по молекулској маси у другој димензији). На овај начин су настале 2D мапе протеина бактерије *Escherichia coli* [3], заморца [4] и миша [5]. Међутим, тек са развојем масене спектрометрије високе осетљивости било је могуће идентификовати протеине раздвојене методом дводимензионалне електрофорезе. Развој метода раздвајања и идентификације протеина и напредак на пољу секвенцирања читавих генома омогућио је једноставну идентификацију великог броја протеина на основу прецизно одређене масе пептидних фрагмената насталих деградацијом ензимима високе специфичности, масеном спектрометријом и претраге протеинских база података бионформатичким алатима.

Основна протеомичка анализа обухвата неколико корака:

- раздвајање комплексне протеинске смеше на појединачне компоненте, најчешће методом дводимензионалне електрофорезе протеина (енг. 2-dimesional

- polyacrylamide gel electrophoresis, 2D PAGE);
- исецање циљаних протеина из гела (или свих раздвојених протеина), тзв. прикупљање тачака;
- фрагментација протеина у гелу дејством ензима, најчешће трипсина;
- пречишћавање пептида;
- одређивање прецизне масе трипсином генерисаних пептида масеном спектрометријом уз различите изворе јонизације
- идентификација протеина претраживањем протеинских база података методом „отиска прста“ или методом преклапања спектра. Метода преклапања спектра је далеко поузданија, али може да се примењује искључиво уколико су спектри снимљени уређајима који могу да фрагменишу пептиде у масеном спектрометру (тзв. тандем масена спектрометрија).

Основна примена протеомике у области алергијских обољења базира се на традиционалном приступу идентификације протеина који везују имуноглобулин Е исецањем истих из гела и одређивањем идентитета датог протеина гореописаном методом (фрагментација протеина трипсином на пептиде који се тандем масеном спектрометријом анализирају, а пептиди идентификују методом поређења спектра са *in silico* дигестованим спектрима протеина у базама података). Идентификација протеина се потом заснива на проналажењу масеном спектрометријом бар два пептида која само дати протеин поседује у бази података (јединствени протеини, енгл. *unique peptides*).

Овим приступом смо анализирали имуноглобулин Е-везујуће протеине различитих алергених извора (полена амброзије, полена јежевице, кикирикија, црвеног меса [6–10]). Највећи изазови ове анализе леже у анализи биљних протеома или других протеома за које не постоји довољан број података у биоинформатичким базама података. Базе података (попут NCBI, UniProt) се хране из комплетно секвенцираних генома, транскриптома и секвенцираних протеина. Најпотпунији подаци постоје за оне врсте чији су геноми потпуно секвенцирани. Биљни геноми, најинтересантнији за нас који проучавамо алергијска обољења, нису секвенцирани у великом броју. Претраживање података је отежано, а идентификација протеина је могућа само на основу сличности

са већ секвенцираним генима, или протеинима, уз употребу биоинформатичких алата.

### 3. Пептидомика (дигестомика и деградомика)

Модернији приступи анализи укупних протеина узорка (били то ћелија, ткиво, орган, или читави организми), тзв. одређивање протеома методом “shotgun” протеомике, данас више не обухватају и корак раздвајања протеина, већ раздвајање и идентификацију пептида насталих фрагментацијом свих протеина у датом узорку. Фрагментација може да се ради употребом ензима трипсина, који се користи као класичан ензим за потребе фрагментације протеина у циљу идентификације, а до фрагментације протеина може да дође и услед пепсинске дигестије, или дигестије панкреатином током процеса физиолошке дигестије хране. У том случају, аналитика тако насталих пептида добила је посебан назив – дигестомика, иако је у суштини подтип пептидомике – аналитике пептида високе пропусности. Слично је и са називом деградомика. У питању је подтип пептидомике, а односи се на аналитику пептида насталих деградацијом протеина ензимима ендолизозома током поступка деградације протеина за потребе представљања епитопа ћелијама имуног система. Дигестомика је од значаја у науци о исхрани, док резултати добијени деградомиком помажу у дизајну вакцина и расветљавању механизме болести имуног система, као што су нпр. алергијске болести [11, 12].

### 4. Алергије на храну

Дигестомика је од посебног значаја и за разумевање молекуларних основа алергија на храну, обољења које погађа углавном децу, а карактерише га неадекватан одговор имуног система на иначе безопасне протеине хране. И даље је велика непознаница због чега само неки протеини хране изазивају алергијска обољења, а други не. Није још увек познато који структурни елементи протеина исти чине алергеном, иако је познат и описан велики број алергена различитих извора [13].

За претрагу описаних алергена препоручујем базе попут базе регистрованих алергена WHO/IUIS Allergen Nomenclature ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)), одобрене од стране Светске здравствене организације и Међународне уније имунолошких друштава (World Health Organization and International Union of Immunological Societies, WHO/IUIS) или нешто опширнију базу Allergome ([www.allergome.org](http://www.allergome.org)), која обухвата и нерегистроване алергене. У Табели 1 дат је приказ алергена кикирикија регистрованих при Светској здравственој организацији.

Алерген	Молекулска маса (kDa)	Особине
Ara h 1	64	Резервни протеин (купин)
Ara h 2	17	Резервни протеин (2С албумин, конглутин)
Ara h 3	60, 37 (фрагментисан)	Резервни протеин (11С глогулин, купин)
Ara h 4	Добио нови број - Ara h 3.02	Једна од изоформи Ara h 3
Ara h 5	15	Профилин
Ara h 6	15	Резервни протеин (конглутин), сличан Ara h 2
Ara h 7	15	Конглутин, протеин сличан Ara h 2
Ara h 8	17	PR-10
Ara h 9	10	Неспецифичан протеин који преноси липиде типа 1, nsLTP
Ara h 10	16	16 kDa, Олеозин
Ara h 11	14	14 kDa, Олеозин
Ara h 12	5,2	Дефенсин
Ara h 13	14	Дефенсин
Ara h 14	17,5	Олеозин
Ara h 15	17	Олеозин
Ara h 16	8,5	Неспецифичан протеин који преноси липиде типа 1, nsLTP
Ara h 17	11	Неспецифичан протеин који преноси липиде типа 1, nsLTP

Табела 1. Алергени протеини кикирикија (преузето са [www.allergen.org](http://www.allergen.org)).

#### 4.1 Отпорност алергена хране на дигестију

Још давне 1996. постављена је теорија према којој отпорност на дигестију пепсином протеин чини потенцијалним

алергеном [14]. Дигестија пепсином се одвија у горњим деловима гастроинтестиналног тракта и претходи интестиналној дигестији током које се додатно деградирају фрагменти протеина настали деградацијом пепсином. Само потпуно очувани или делимично очувани фрагменти протеина отпорни на дигестију могу да интерагују са имуним системом и доведу до алергијске сензитизације и алергијске реакције. До овог контакта може да дође одмах после желудачне дигестије и због тога се отпорност протеина на пепсинску дигестију сматра важном особином алергених протеина.

Аствуд и сарадници су у симулираним условима желудачног тракта пратили дигестију пречишћених алергена хране и дошли су до закључка да су сви описани алергени отпорни на дигестију [14]. Међутим, теорија је доведена у сумњу јер су описани протеини који су алергени, али се лако дигестују пепсином у тесту који су применили Аствуд и сарадници [15, 16]. Пример таквог алергена је казеин из млека, за који смо показали да се лако деградира и у полимеризованом облику укрштено-повезан током обраде хране (докторски пројекат др Драгане Станић-Вучинић) [17].

Међутим, све ове раније студије су критиковане због тога што су отпорност алергена на дигестију пепсином тестирали у симулираним условима желудачне дигестије са пречишћеним протеинима [16]. Занемаривало се присуство матрикса хране. Постојање матрикса, који са једне стране отежава приступ ензима протеину, а са друге може да садржи супстанце које инхибирају дигестију, може значајно да утиче на кинетику дигестије (а тиме и на полуживот протеина) па је самим тим неизбежан параметар који је требало узети у обзир. Потешкоћа једног таквог системског приступа била је у томе да у научној јавности није био постигнут договор по питању тачних услова који најбоље симулирају физиолошке услове дигестије. Бројне студије су се бавиле дигестибилношћу протеина али њихове резултате је било тешко упоређивати, пре свега зато што су различите групе користиле различите протоколе [18]. Додатно, методолошки проблеми аналитике протеина и пептида у присуству матрикса нису били занемарљива препрека примени симулираног процеса дигестије у систематској анализи отпорности протеина на дигестију пепсином.

Међународна мрежа која је разматрала процес дигестије у сврху побољшања квалитета и безбедности хране формирана је 2010. године [19]. Мрежу је финансирао програм европске сарадње у науци и технологији (Cooperation in Science and Technology, COST) а сама акција је имала назив Infogest (<https://www.cost-infogest.eu/ABOUT-Infogest>). Универзитет у Београду је био један од партнера на овом пројекту (<https://www.cost-infogest.eu/PARTNERS>).

Главни резултат овог пројекта је хармонизовани протокол за симулирану дигестију чврсте хране [20], познат и као Infogest протокол. Овај протокол је узео у обзир физиолошке услове дигестије и препоручио количине и концентрације дигестивних ензима, као и трајање све три фазе дигестије хране (орална, желудачна и интестинална). Пројекат је организовао и обуку за примену овог протокола (на првој радионици Infogest протокола, на коме је само 15 полазника из читавог света прошло курс дигестије хране по хармонизованом протоколу, нашу групу је заступала Маја Крстић). Додатно, пројекат је обезбедио и интерактивну страницу (<http://www.proteomics.ch/IVD/>) за припрему раствора и ензима који се користе у дигестији да би олакшао примену хармонизованог статичког протокола за дигестију хране, као и филмске клипове који могу да се виде на COST Action Infogest YouTube каналу ([https://www.youtube.com/channel/UCdc-NPx9kTDGyH\\_kZCgpQWg](https://www.youtube.com/channel/UCdc-NPx9kTDGyH_kZCgpQWg)). О значају овог консензуса који је постигла међународна мрежа Infogest говори и чињеница да је основна публикација Infogest протокола привукла значајну пажњу научне јавности и стекла око 900 цитата за само пет година. Ове године објављена је и унапређена верзија овог протокола, Infogest 2.0, публикована у реномираном часопису *Nature protocols* [21]. Од 2016. године Infogest је постала међународна мрежа која окупља више од 400 научника из 140 института из читаве Европе, али и из САД, Канаде, Аргентине, Аустралије и Новог Зеланда. Универзитет у Београду је један од партнера ове међународне мреже.

Наша група је била међу првим групама у свету која је почела да примењује овај протокол у разматрањима дигестбилности алергена у њиховом матриксу. Наши први задаци односили су се на решавање методолошких проблема у анализи протеина, односно пептида након дигестије.

Да бих појаснила ове проблеме, укратко ћу да се осврнем на основне кораке у анализи дигестије протеина. Протокол пепсинолизе алергена, онако како су га Аствуд и сарадници описали, подразумева излагање једног бистрог протеинског раствора ензиму. Таква смеша без превише додатне припреме лако се анализира електрофорезом или течно-масеном спектрометријом. У случају дигестије чврсте хране, протеини и пептиди који су се ослободили дигестијом хране ослобађају се из чврстог узорка и прелазе у течну фазу, али их прате и остале компоненте хране, шећери и липиди. Од осам великих узрочника алергијских обољења пореклом из хране, млеко, кикирики, соја, јаја и орашице су богати липидима. Узрочници алергија попут жита су богати шећерима, а риба и морски плодови су богати протеинима. Управо присуство липида значајно омета аналитику протеина и пептида. Због тога су истраживања наше групе примарно била фокусирана на решавање методолошких проблема у анализи производа дигестије липидима богатих извора (кикирики, орашице) који су представљали највећи методолошки изазов (докторски пројекат Иване Продић, Универзитет у Београду).

### 5. Дигестомика кикирикија по Infogest протоколу

Један од осам најважнијих узрочника алергија на храну је кикирики. То је такође један од најопаснијих узрочника алергија, јер се реакције на алергене кикирикија јављају већ при уносу јако малих количина кикирикија које се могу наћи у великом броју прехранбених производа. Алергија на кикирики је описана након уноса како сировог, тако и куваног и печеног кикирикија. То значи да су алергени протеини кикирија изузетно стабилни и да њихову структуру није лако нарушити загревањем или хемијским третманом (нпр. у јако киселим условима какви владају у желуцу). Описано је чак око 16 алергених протеина пореклом из кикирикија (Табела 1) и више њихових изоформи, али најважнији су резервни протеини под називом 2S албумини, Ara h 2 и Ara h 6, као и Ara h 1 и Ara h 3.

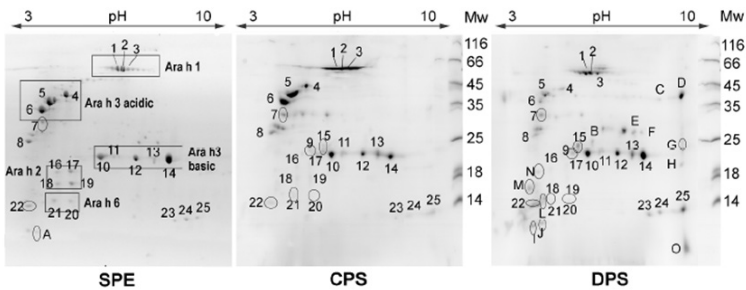
Наша група је применила хармонизовани статички протокол за дигестију читавог зрна кикирикија у циљу бољег разумевања процеса деградације алергена кикирикија [10].



Циљеви студије су били:

- карактеризација пептида резистентних на дигестију комбинацијом приступа 2D PAGE-nanoLC-MS (енг. nano Liquid chromatography–mass spectrometry) и “shotgun” анализе пептида ослобођених дигестијом;
- карактеризација имунореактивности ових пептида.

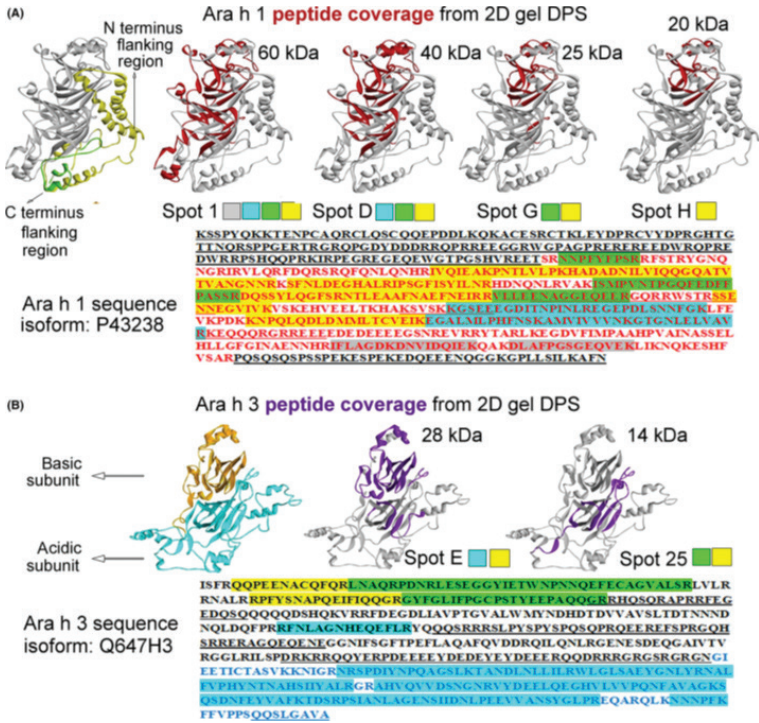
У циљу карактеризације пептида резистентних на дигестију помоћу 2D PAGE-nanoLC-MS, применили смо следећи експериментални приступ: уситњавање целог сировог зрна кикирикија, орална и желудачна фаза дигестије према стандардним протоколу, уклањање липида екстракцијом органским растварачима и анализа дигестоване смеше методом дводимензионалне електрофорезе високе резолуције уз идентификацију протеина масеном спектрометријом. Паралелно су анализирани и контролни узорци: у симулираним гастроинтестиналним течностима без додатка ензима (Слика 1, CPS), као и екстракт протеина кикирикија припремљен према стандардном протоколу (Слика 1, SPE).



Слика 1. Дводимензионалне електрофорезе високе резолуције екстракта протеина кикирикија припремљеног према стандардном протоколу (SPE), контролном узорку кикирикија који није био изложен дигестивним ензимима (CPS) и дигестованог узорка кикирикија (DPS). Све тачке које се поклапају на мапама су обележене бројевима и анализирани су масеном спектрометријом. Све тачке које нису могле да се покlope обележене су великим словима и такође анализирани масеном спектрометријом. Mw – протеински стандарди за одређивање молекулских маса. Преузето уз дозволу издавача из [10].

Овим приступом је било могуће прецизно дефинисати распад главних алергена кикирикија који су након двочасовне дигестије у дигесту кикирикија били присутни у виду неколико структурних форми: као потпуно очувани (тачке 1, 2 и 3, које одговарају алергену Ara h 1 на Слици 1, налазе се у

свим узорцима), као делимично деградираних форме алергена Ara h 1 (тачке D, H, G), односно потпуно очуване изоформе алергена Ara h 3 (тачке 10, 11, 12, 13, 14) и деградираних форме Ara h 3 (тачка E и тачка 25).



Слика 2. Главни фрагменти Ara h 1 и Ara h 3 отпорни на дигестију пепсином. А) Тродимензиона структура Ara h 1; ванјезгарни N-терминални регион је у жутој, ванјезгарни С-терминални регион је у зеленој, док је регион језгра у сивој боји. Главни пептиди Ara h 1 отпорни на дигестију пепсином нађени у тачкама са дводимензионе електрофорезе: тачка 1 (око 60 kDa), тачка D (око 40 kDa), тачка G (око 25 kDa) и тачка H (око 20 kDa). Пептиди су приказани у црвеној боји. Б) Тродимензиона структура Ara h 3; базна подјединица је у наранџастој, а кисела подјединица у светло плавој боји. Главни пептиди Ara h 3 отпорни на дигестију пепсином нађени у тачкама са дводимензионе електрофорезе: тачка E (око 30 kDa) и тачка 25 (око 14 kDa). Пептиди су приказани у љубичастој боји. За приказивање тродимензионих структура главних алергена кикирикија коришћене су кристалне структуре Ara h 1 (PDB entry 3SMH) и Ara h 3 (PDB entry 3C3V). Преузето уз дозволу издавача из [10].

Уз податке добијене масеном спектрометријом било је могуће и моделовати производе деградације алергена. Приступ је био следећи: трипсином добијени фрагменти су идентификовани масеном спектрометријом и приказани на структури интактног алергена. Може се уочити да идентификовани пептиди припадају истом структурном домену у молекулу алергена, односно да се током деградације пепсином прво уклањају делови структуре протеина који се налазе у флексибилним регионима N- и C-терминуса протеина (Слика 2). Наша студија је такође показала да главни алергени остају потпуно очувани и имунореактивни након двочасовног излагања пепсину.

Због чега је ова студија, прва такве врсте, од значаја за боље разумевање алергија на храну? Наша студија је јасно показала да и након двочасовне дигестије у условима који симулирају физиолошке услове дигестије, главни алергени опстају као потпуно очувани, али су присутни и у другим формама које су по својој величини довољне да изазову алергијску реакцију. Поређења ради, други аутори који су анализирали дигестију ових алергена пепсином јасно су показали да се исти лако дигестују и након два сата потпуно губе своју основну структурну форму (интактну молекулску масу) (Табела 2).

На основу наших резултата било је могуће не само показати да липидима богат матрикс хране значајно утиче на процес деградације већ и проценити ефекат присуства матрикса на полуживот алергена у дигестивном флуиду. Узевши у обзир наше податке до којих смо дошли анализирајући комплетно зрно кикирикија и резултате до којих су дошли други аутори (Табела 2), наша процена је била да се у присуству матрикса полуживот алергена продужава и за око 600%.

У другом делу студије која се бавила дигестомиком кикирикија фокусирали смо се на аналитику кратких пептида које је пепсин ослободио из основне форме алергена. Ови кратки пептиди, иако способни да везују имуноглобулин Е, нису довољно велики да унакрсно повежу два молекула имуноглобулина Е, а то је неопходан предуслов за ослобађање хемијских супстанци алергијске инфламације из ћелија које их складиште. Да бисмо их анализирали, морали смо

Алерген	Величина алергена (kDa)	Масени однос пепсина и алергена у финалној дигестионој смеши	Ензимска активност у финалној дигестионој смеши (број јединица/ милиграму)	pH финалне дигестионе смеше	Екстракт кикирикија / Пречишћени протеин	Време трајања дигестије (мин.)	Стабилност протеина током дигестије (мин.)	Величина пептидног фрагмента (kDa)
Ага h 1, купин (тип вицоллина, 7S глобулин)	64	nd	170	2.5	ПП	120	< 10	<4
		0.025	80	2.1	ПП		1	<20
		0.05	162	2.5	ПП	120	1	5.5
		12.8	н.о.	1.2	ПП	120	5	н.о.
		3.04	10,000	1.2	ПП	60	0.5	н.о.
		0.3	1,000	1.2	ПП	60	0.5	н.о.
		0.03	100	1.2	ПП	60	0.5	н.о.
		3.04	10,000	1.2	ЕК	60	0.5	н.о.
		0.63	2540	1.2	ЕК	60	1	н.о.
0.0001	н.о.	2	ЕК	1200	30	<35		
Ага h 2, конглутин (2S албумин)	17	3	10,000	1.2	ПП	60	0-2	10
		3	10,000	2	ПП	60	0-30	10
		19	н.о.	1.2	ПП	60	/	/
		12.8	н.о.	1.2	ПП	120	0.5	н.о.
		3.04	10,000	1.2	ПП	60	16	10
		0.3	1,000	1.2	ПП	60	/	/
		0.03	100	1.2	ПП	60	/	/
		3.04	10,000	1.2	ЕК	60	16	/
0.63	2540	1.2	ЕК	60	15	н.о.		
Ага h 3, купин (тип легумина, 11S глобулин, глицинин)	60	3.04	10,000	1.2	ПП	60	0.25	н.о.
		0.3	1,000	1.2	ПП	60	0.25	н.о.
		0.03	100	1.2	ПП	60	0.25	н.о.
		0.002	н.о.	2	ПП	120	<2	<14
		3.04	10,000	1.2	ЕК	60	0.25	н.о.
		0.63	2540	1.2	ЕК	60	1	н.о.
Ага h 6, конглутин (2S албумин)	15	3.04	10,000	1.2	ПП	60	4	10
		0.3	1,000	1.2	ПП	60	16	10
		0.03	100	1.2	ПП	60	/	/
		3.04	10,000	1.2	ЕК	60	60	10
		0.63	2540	1.2	ЕК	60	15	н.о.

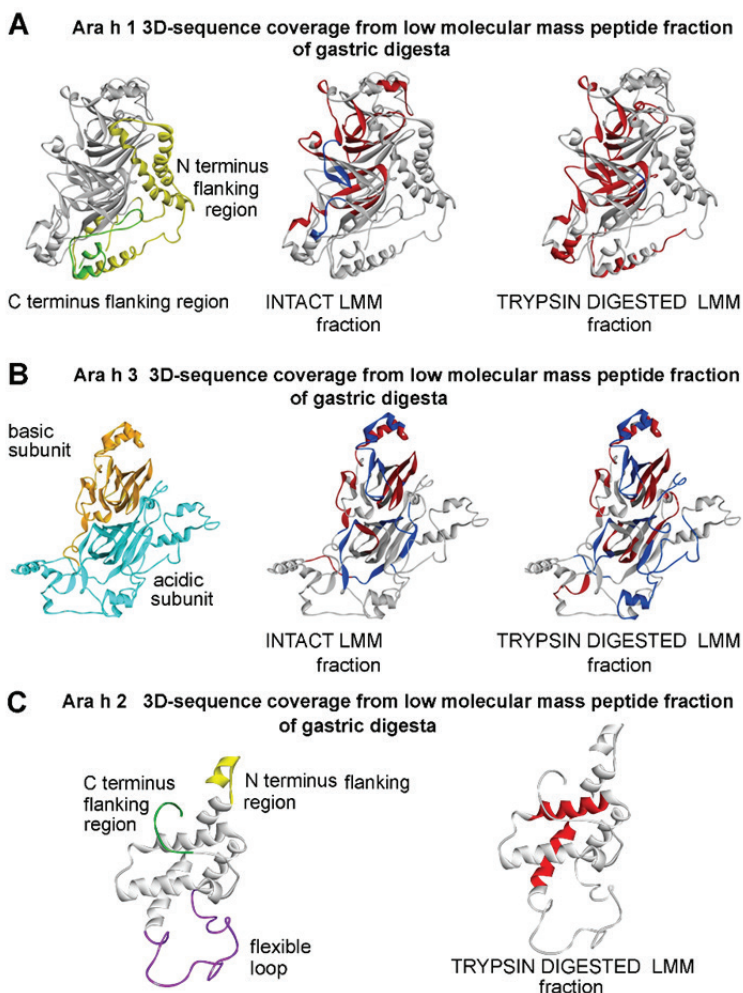
Табела 2. Сумирани публиковани подаци о дигестибилности алергена кикирикија у *in vitro* симулираним условима гастричне дигестије. ЕК – екстракт кикирикија, ПП – пречишћени протеин, н. о. – није одређивано. Прерађено из [10], уз дозволу издавача.

претходно да их пречистимо из реакционе смеше методом гел филтрације. Наш резултат је показао да су настали фрагменти имунореактивни и значајније хидрофобни од остатка протеина. Хидрофобност сегмената пептида би могла да буде основа њихове агрегације, а путем агрегације би могле да настану и структуре које подсећају на очувани алерген и могу да изазову алергијску сензитизацију и алергијску реакцију (Слика 3).

Истраживања других аутора на животињским моделима алергије на кикирики су показала да смеша пептида пореклом из алергена Aга h 1 може да изазове алергијску реакцију [22]. Аутори су изнели хипотезу по којој је управо агрегација пептида неопходан предуслов за ову реакцију.

Након развоја ове методологије на модел систему кикирикија, систематичан приступ овој проблематици подразумева и примену стандардизованог протокола и стандардизованих метода у анализи дигеста и на другим значајним узроцима алергијских обољења, као што су млеко (докторски пројекат др Јелене Радосављевић, Универзитет у Београду), лешник (докторски пројекат Иване Продић, Универзитет у Београду), морски плодови (докторски пројекат Урмиле Кулал, Универзитет Гент). Резултати дигестомике млека потврдили су нашу претпоставку. Дигестија пепсином није успела да фрагментира IgE-везујуће епитопе главних алергена млека и исти су били подложни агрегацији. Агрегирани пептиди су били имунореактивни и способни да изазову ослобађање медијатора алергијске инфламације из ћелија имуног система (Ј. Радосављевић, докторска дисертација).

Треба напоменути да су наши први резултати из ове области објављени још 2007. године [23]. Та прва студија је указала на значајан утицај присуства полисахарида у матриксу воћа на процес дигестије протеина (докторски пројекат др Наталије Половић). Ови експерименти су рађени у условима симулираног желудачног флуида према тада препорученом протоколу (веома висока концентрација пепсина) и уз методологију која нам је била доступна у датом тренутку (електрофореза, имуноблот уз употребу специфичних антитела). Показали смо да су, иначе лабилни, протеини воћа у присуству пектина (киселих полисахарида воћа) значајније отпорни на дигестију пепсином, панкреатином, а и у животињским моделима дигестије [23–25]. Ти први резултати који су указали на значај матрикса хране у процесу дигестије



Слика 3. Региони са идентификованим пептидима Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 нађени у фракцији кратких пептида отпорних на дигестију пепсином (енг. digestion-resistant peptides, DRPs) издвојеној након дигестије кикирикија пепсином. А) Тродимензиона структура Ara h 1; слика лево: ванјезгарни N-терминални регион је у жутој, ванјезгарни C-терминални регион је у зеленој, док је регион језгра у сивој боји; слика у средини: интактни пептиди; слика десно: пептиди нађени након редукције, алкилације и дигестије трипсином фракције DRPs. Региони који садрже пептиде који одговарају континуалним епитопима алергена кикирикија (на основу претраживања у бази података The Immune Epitope Database – IEDB) су у црвеној боји, док су региони са

пептидима који не одговарају епитопима у плавој боји. В) Тродимензиона структура Ara h 3; слика лево: базна подјединица је у наранџастој, а кисела подјединица у светлоплавој боји; слика у средини: интактни пептиди; слика десно: пептиди нађени након редукције, алкилације и дигестије трипсином фракције DRPs. Региони који садрже пептиде који одговарају континуалним епитопима алергена кикирикија (на основу претраживања у бази података IEDB) су у црвеној боји, док су региони са пептидима који не одговарају епитопима у плавој боји. С) Тродимензиона структура Ara h 2; слика лево: флексибилна петља је приказана у љубичастој, N-терминални регион је у жутој, док је C-терминални регион у зеленој боји; слика десно: пептиди нађени након редукције, алкилације и дигестије трипсином фракције DRPs су приказани у црвеној боји и одговарају континуалним епитопима алергена кикирикија (на основу претраживања у бази података IEDB). За приказивање тродимензионих структура главних алергена кикирикија коришћене су кристалне структуре Ara h 1 (PDB entry 3SMH), Ara h 2 (PDB entry 3OB4) и Ara h 3 (PDB entry 3C3V).

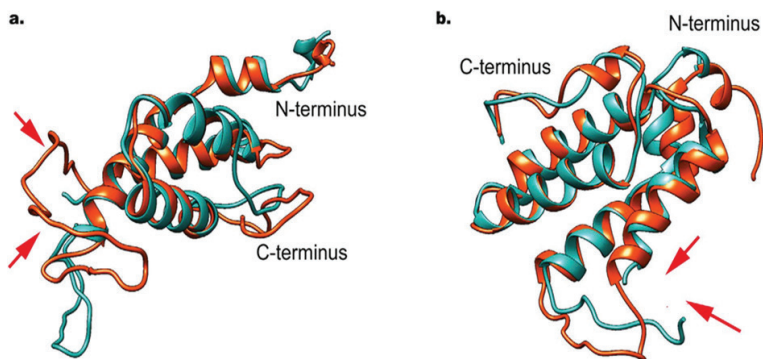
алергена воћа добили су значајну пажњу научне и шире јавности (чланак објављен у британском листу *Economist* – <https://www.economist.com/science-and-technology/2007/05/10/protect-and-die>). Додатно смо се бавили и интерферирајућим супстанцама у процесу пепсинске дигестије, пре свих полифенолима [26, 27], као и ефектима обраде хране на дигестију протеина пепсином у условима симулиране дигестије, а у одсуству матрикса [28–31] (докторски пројекат др Драгане Станић-Вучинић, докторски пројекат др Зијада Тантуша, докторски пројекат др Марије Стојадиновић).

## 6. Хеминформатика и протеомика: симулација и валидација протеолитичке деградације протеина

Специфичност процеса фрагментације алергена кикирикија нас је подстакла да се бавимо структурним елементима протеина који би могли да нам укажу на разлоге такве фрагментације. Као модел систем изабрали смо главне алергене кикирикија, 2S албумине, Ara h 2 и Ara h 6, и ензим трипсин, који за разлику од пепсина показује изражену специфичност према базним аминокиселинама у протеинској секвенци и на тај начин даје фрагменте који су веома прецизно дефинисани. Биоинформатички портали попут *PeptideCutter* ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)) на основу задатих параметара,

попут секвенце протеина (или шифре у базама података) и дигестивног ензима, могу да генеришу листу фрагмената (пептида) и број циљних места дигестије. На примеру 2S албумина кикирикија (шифра CONG7\_ARAHY) и ензима трипсина, може се видети да комплетна протеолиза овог ензима трипсином генерише 24 фрагмента, односно да су у секвенци протеина присутна 23 циљна места за деградацију (базни остаци аминокиселина аргинина и лизина). Овај портал смо искористили да бисмо генерисали податке за Сliku 6. Свака тачка приказана на њој (d, e, f) представља циљно место протеолизе. Тачке означене црвеном бојом су оне које смо експериментално валидирали у експерименту делимичне протеолизе протеина трипсином.

Наша полазна хипотеза је била да у молекулу алергена нису сви базни остаци аминокиселина подједнако доступни и подједнако подложни дејству ензима. Један од параметара за које је познато да могу да утичу на ефикасност протеолизе је доступност аминокиселинског остатка ензиму, а он може да се прати мерењем флексибилности аминокиселинског остатка који је циљни остатак за протеолизу. Познато је да су региони протеина који су покретљивији доступнији протеазама и тиме и бољи циљеви протеолизе. Наша идеја је била да упоредимо квантитативне податке до којих смо дошли



Слика 4. Тродимензионална структура пептида отпорних на дигестију преклопљених са интактним протеином. Слика а: Ага h 2.02; Слика б: Ага h 6. Структуре у црвеној боји представљају конформације интактних протеина, а структуре у плавој боји представљају одговарајуће пептиде отпорне на дигестију. Стрелице показују места протеолизе указујући на то да су неструктурирани делови протеина најподложнији протеолизи (преузето уз дозволу издавача из [32]).

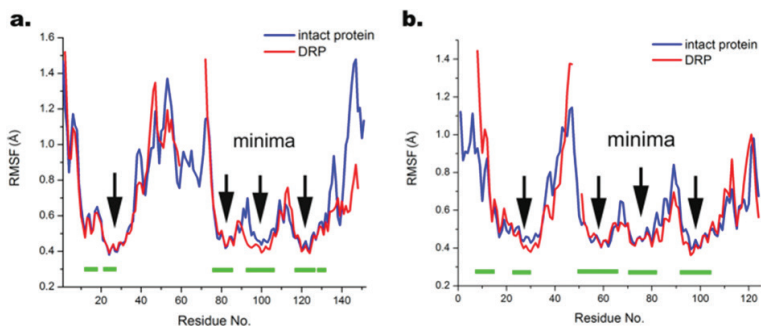


симулацијом молекулске динамике протеина са експериментално одређеним аминокиселинским остацима за које смо утврдили да су лако доступни трипсину.

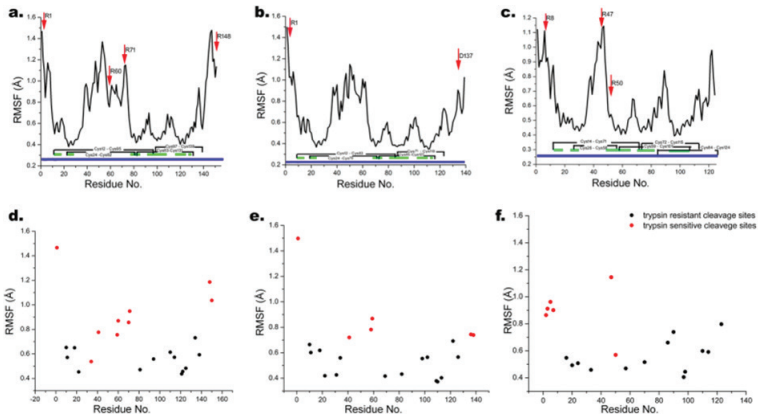
У циљу решавања овог проблема, ми смо делимично деградиране алергене кикирикија анализирали масеном спектрометријом и прецизно одредили молекулске масе резистентних фрагмената [32]. На основу ових података, одредили смо и примарну структуру фрагмената дигестије (Слика 4).

Симулацијом њихове молекулске динамике, закључили смо да су резистентни пептиди алергена кикирикија стабилнији од родитељских протеина. Процесом протеолизе из структуре алергена прво се уклањају региони велике покретљивости и заостаје језгро протеина које је према нашим подацима веома стабилно на даљу деградацију трипсином.

Покушали смо и да упоредимо податке до којих смо дошли експериментима, у којима смо одређивали циљна места протеолизе (одређена масеном спектрометријом), са подацима о флексибилности датих региона протеина до којих смо дошли методама хемоинформатике. Показало се да је могуће са великом прецизношћу дефинисати вероватноћу исецања протеина протеазом на датом циљном остатку на основу вредности средње квадратне флукуације (енг. Root



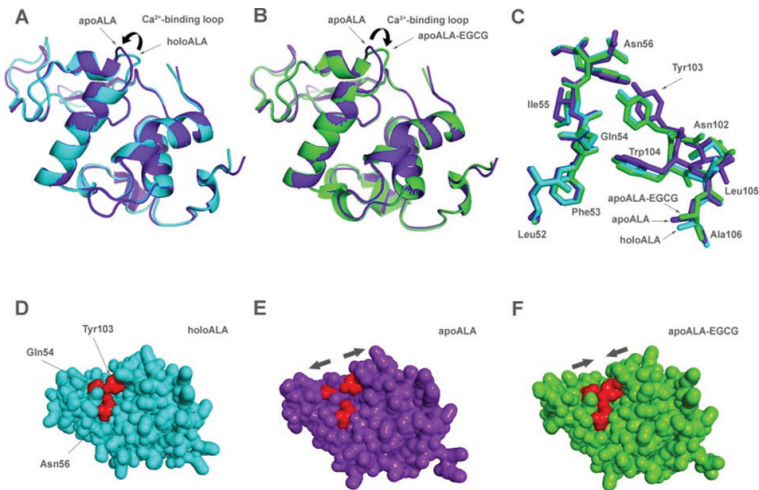
Слика 5. Варијације вредности средње квадратне флукуације (енг. Root Mean Square Fluctuation, RMSF) дуж секвенце интактних изоформи конглутина и пептида отпорних на дигестију (енг. digestion-resistant peptides, DRPs). Слика а: Поређење RMSF профила Ara h 2.02 и његових DRPs; Слика б: Поређење RMSF профила Ara h 6 и његових DRPs. Стрелице показују минимуме RMSF вредности који су на позицијама лоцираним у  $\alpha$ -хелијачном региону протеина. Зеленим линијама су означени делови протеинских секвенци који садрже  $\alpha$ -хеликс као секундарну структуру (преузето уз дозволу издавача из [32]).



Слика 6. Варијације вредности средње квадратне флукуације (енг. Root Mean Square Fluctuation, RMSF) дуж секвенце интактних изоформи конглутина и места подложних протеолизи трипсином на пептидима отпорним на дигестију (енг. digestion-resistant peptides, DRPs). Горњи ред (слике a, b, c): интактни конглутини; доњи ред (слике d, e, f): места подложна протеолизи трипсином на DRPs. Сlike лево (a, d): Ara h 2.02; слике у средини (b, e): Ara h 2.01; слике десно (c, f): Ara h 6. Стрелице показују места протеолизе трипсином. Плаве линије представљају протеинске секвенце. Зелене линије представљају делове протеинских секвенци који садрже  $\alpha$ -хеликс као секундарну структуру. У доњем реду у црвеним тачкама су представљена места у секвенци која су осетљива на протеолизу трипсином, док су црним тачкама представљена места резистентна на дејство трипсина (преузето уз дозволу издавача из [32]).

Mean Square Fluctuation, RMSF), која заправо описује релативну мобилност датог аминокиселинског остатка (Слика 6).

У наставку ових истраживања највише нас је занимало како се структура и флексибилност протеина мењају са повећањем температуре (током обраде хране) и да ли то може да утиче на процесе деградације протеина ензимама. Такође смо се бавили и симулацијом молекулске динамике алергена у присуству и одсуству конститутивно присутних јона метала (лакталбумин и јон калцијума) по везивању лиганда пореклом из хране (Слика 7) [33]. Лакталбумин је веома специфичан алерген хране – веома нестабилан у одсуству калцијума којег конститутивно везује и веома интересантан за проучавање феномена стабилности протеина хемоинформатичким методама. Наши резултати су показали да је стабилизација протеина везивањем метала и везивањем



Слика 7. Преклопљене конформације (А) холо алфа-лакталбумина (холоАЛА) и апо-лакталбумина (апоАЛА), и (В) апоАЛА и комплекса апоАЛА са епигалокатехин-3-галатом (апоАЛА-ЕГЦГ) након симулиране молекулске динамике (СМД). Црне стрелице показују регионе на чију је конформацију уклањање јона калцијума највише утицало, док им је везивање ЕГЦГ повратило првобитну конформацију (регион калцијум-везујуће петље). (С) Преклапање аминокиселинских остатака у региону улаза у пукотину холоАЛА, апоАЛА и апоАЛА-ЕГЦГ, који приказује промену позиције остатка тирозина 103 услед уклањања јона калцијума, као и његов повратак на готово првобитну позицију услед везивања ЕГЦГ. Молекулске површине (D) холоАЛА, (E) апоАЛА и (F) апоАЛА-ЕГЦГ које показују регион улаза у пукотину након СМД. Као последица промене позиције остатка тирозина 103 у апоАЛА долази до благог отварања пукотине (црне стрелице), док везивање ЕГЦГ враћа првобитну затвореност пукотине (црне стрелице). ХолоАЛА структура је приказана у светло плавој боји, апоАЛА у љубичастој и апоАЛА-ЕГЦГ у зеленој боји. Све структуре су добијене на основу просечних конформација главних кластера холоАЛА, апоАЛА и апоАЛА-ЕГЦГ након СМД. АпоАЛА структура је добијена тако што је јон калцијума уклоњен из кристалне структуре холоАЛА (PDB ID 1F6S) (преузето уз дозволу издавача из [33]).

полифенолним лигандом пореклом из зеленог чаја мерљив феноменом који прате веома дискретне промене молекулске динамике самог протеина и његових комплекса (Слика 7) [33, 34].

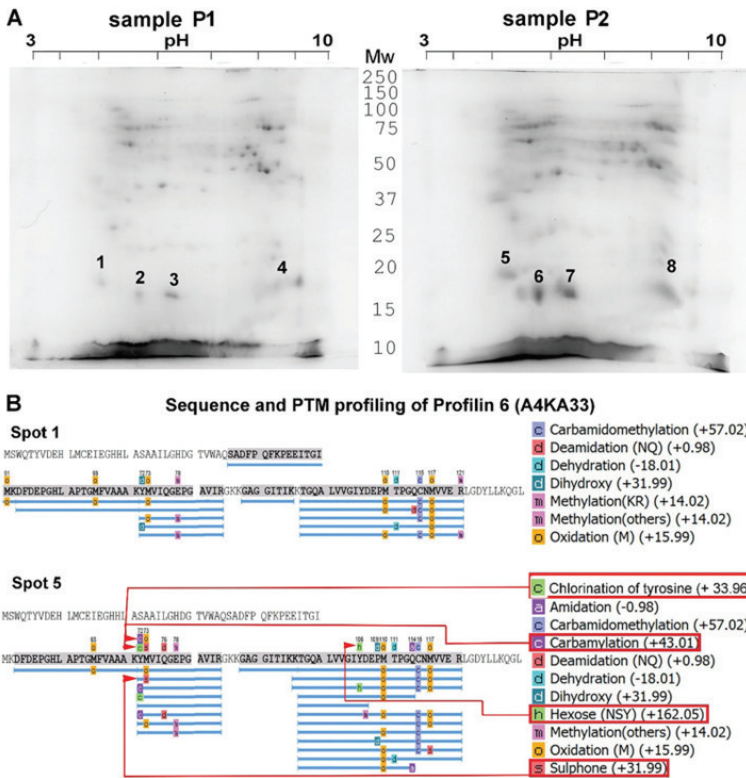
Хемоинформатичке студије су резултат плодотворне мултидисциплинарне сарадње са групом професора Милоша Милчића, који се бави рачунарском хемијом на Универзитету

у Београду. Све веома захтевне симулације молекуларне динамике алергена, њихових фрагмената и комплекса алергена са лигандима (докторски пројекат Милице Радивратовић, Универзитет у Београду, докторски пројекат Аје Ал-Ханиш, Универзитет у Београду) рађена су на суперрачунару „Парадокс“, који је стационаран на Институту за физику. Протеомичке анализе су рађене на нашем масеном спектрометру високе резолуције на Хемијском факултету.

### **7. Модификација хране током обраде и дигестије хране и под утицајем загађења животне средине**

Везе које постоје између загађености животне средине, квалитета хране и здравља на молекуларном нивоу су сложене и још увек недовољно проучене. Алергијска обољења горњих респираторних путева, али и алергије на храну су у порасту у свету, а посебно у индустријски развијенијим земљама. Могуће је да постоји веза између значајнијег уноса обрађене хране, квалитета ваздуха и земљишта са алергијским обољењима. Ова веза би могла да постоји и на молекуларном нивоу, а савременим инструменталним и биоинформатичким методама које су нам одскора на располагању ове везе бисмо могли и да пратимо: молекули изложени хемикалијама пореклом из животне средине (полутанти) или технолошки обрађени (додатком адитива, на високој температури) могли би да се мењају под дејством истих и да попут „отиска прста“ указују на стрес којем су били изложени. Тај стрес може да буде биолошки оксидативни стрес, а може да буде и услед присуства нпр. тешких метала, који могу да оксидују аминокиселинске остатке протеина, или под дејством високе температуре, која као таква представља стрес за све биомолекуле.

Управо смо на примеру алергена полена јежевице, прикупљеног на локалитетима са различитим степеном загађености ваздуха и земљишта, показали да је могуће на нивоу појединачних молекула утврдити да су исти били изложени повећаном нивоу стреса, који је корелирао са повећаним садржајем метала (жива и кадмијум). Протеини су показали повећан број оксидативних модификација



Слика 8. А) 2D PAGE Phleum pratense P1 и P2 узорака полена. Означене тачке су упоређиване употребом програма Image Master Platinum 7.0 software и идентификоване масеном спектрометријом. MW: маркери молекулских маса. В) Поређење модификација протеина профилин 6 (пан-алерген Phl p 12, accession number A4KA33) идентификованог у тачки 1 (узорак P1 sample) и тачки 5 (P2 узорак полена загађеног тешким металима). Црвеним квадратима су показане оксидативне модификације пронађене искључиво у узорку P2 (преузето уз дозволу издавача из [6]).

амино-киселинских остатака метионина, лизина, хистидина, пролина (Слика 8). Неки алергени су били изразито модификовани у овим узорцима (нпр. алерген Phl p 6) [6].

Ове промене, које су у појединим протеинима веома изражене, могу значајно да утичу на процесе дигестије и деградације протеина (нпр. уколико се описане модификације налазе на или у близини циљних тачака протеолизе).

Значајан број оваквих модификација показан је и на алергенима кикирикија (докторски пројекат Јелене Михаиловић) изложеним високој температури (током печења кикирикија). Неке од ових модификација су познате (грађење Мајерових производа је добро позната хемијска модификација протеина на високој температури), али неке до сада нису биле описане, јер није било алатки којима се могло детаљно и глобално приступити анализи свих протеинских форми у узорку.

Овај приступ може да помери границе нашег знања о везама на молекуларном нивоу између загађености животне средине, квалитета хране и здравља. Боље разумевање ових веза може да помогне у превенцији и заштити здравља људи и животиња, а може и да подигне свест о сложености штетних ефеката загађења животне средине. Од 2018. године међународни пројекат *FoodEnTwin* (<http://horizon2020foodentwin.rs/sr/home/>), који се финансира из програма *Хоризонти2020*, бави се управо овом темом и координира се из Београда.

### Захвалност

Захвална сам свим својим учитељима, сарадницима, пријатељима и студентима. Радити са њима је увек било само задовољство. Неизмерно сам захвална својим Ћирковићима и Величковићима, јер су увек били уз мене.

### Литература

- [1] Andersen, J. S., M. Mann. "Functional genomics by mass spectrometry". *FEBS Lett.*;480 (1) (2000): 25–31.
- [2] Graves, P. R., T. A. Haystead. "Molecular biologist's guide to proteomics". *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 66 (1) (2002): 39–63; table of contents.
- [3] O'Farrell, P. H. "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". *J. Biol. Chem.* 250 (10) (1975): 4007–4021.
- [4] Scheele, G. A. "Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins". *J. Biol. Chem.* 250 (14) (1975): 5375–5385.
- [5] Klose, J. "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals". *Humangenetik* 26 (3) (1975): 231–243.

- [6] Smiljanic, K., I. Prodic, D. Apostolovic, A. Cvetkovic, D. Veljovic, J. Mutic et al. "In-depth quantitative profiling of post-translational modifications of Timothy grass pollen allergome in relation to environmental oxidative stress". *Environment International* 126 (2019): 644–658.
- [7] Smiljanic, K., D. Apostolovic, S. Trifunovic, J. Ognjenovic, M. Perusko, L. Mihajlovic et al. "Subpollen particles are rich carriers of major short ragweed allergens and NADH dehydrogenases: quantitative proteomic and allergomic study". *Clinical and Experimental Allergy* 47 (6) (2017): 815–828.
- [8] Apostolovic, D., T. A. T. Tran, C. Hamsten, M. Starkhammar, T. Cirkovic Velickovic, M. Van Hage. "Immunoproteomics of processed beef proteins reveal novel galactose- $\alpha$ -1,3-galactose-containing allergens". *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 69 (10) (2014): 1308–1315.
- [9] Ognjenovic, J., N. Milic-Matic, K. Smiljanic, O. Vuckovic, L. Burazer, N. Popovic et al. "Immunoproteomic characterization of Ambrosia artemisiifolia pollen allergens in canine atopic dermatitis". *Veterinary Immunology and Immunopathology* 155 (1–2) (2013): 38–47.
- [10] Prodic, I., D. Stanic-Vucinic. "Influence of peanut matrix on stability of allergens in gastric-simulated digesta: 2S albumins are main contributors to the IgE reactivity of short digestion-resistant peptides". *Clin. Exp. Allergy* 48 (6) (2018): 731–40.
- [11] Stanic-Vucinic, D., M. Stojadinovic, I. Mirkov, D. Apostolovic, L. Burazer, M. Atanaskovic-Markovic et al. "Hypoallergenic acid-sensitive modification preserves major mugwort allergen fold and delivers full repertoire of MHC class II-binding peptides during endolysosomal degradation". *RSC Advances* 6 (91) (2016): 88216–88228.
- [12] Stojadinovic, M., R. Pieters, J. Smit, T. C. Velickovic. "Cross-linking of  $\beta$ -lactoglobulin enhances allergic sensitization through changes in cellular uptake and processing". *Toxicological Sciences* 140 (1) (2014): 224–235.
- [13] Ćirkovic Veličković, T., M. Gavrović-Jankulović. *Food allergens: Biochemistry and molecular nutrition* 2014. 208 p.
- [14] Astwood, J. D., J. N. Leach, R. L. Fuchs. "Stability of food allergens to digestion in vitro". *Nature biotechnology* 14 (10) (1996): 1269–1273.
- [15] Fu, T. J., U. R. Abbott, C. Hatzos. "Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid—a comparative study". *J. Agric. Food Chem* 50 (24) (2002): 7154–7160.
- [16] Bogh, K. L., C. B. Madsen. "Food Allergens: Is There a Correlation between Stability to Digestion and Allergenicity?". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56 (9) (2016): 1545–1567.
- [17] Stanic, D., E. Monogioudi, E. Dilek, J. Radosavljevic, M. Atanaskovic-Markovic, O. Vuckovic et al. "Digestibility and allergenicity assessment

- of enzymatically crosslinked  $\beta$ -casein". *Molecular Nutrition and Food Research* 54 (9) (2010): 1273–1284.
- [18] Velickovic, T. C., J. Radosavljevic, D. Stanic. "Digestibility of food allergens". *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4 (2009): 1–17.
- [19] Dupont, D., A. Bordoni, A. Brodkorb, F. Capozzi, T. Cirkovic Velickovic, M. Corredig et al. "An international network for improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process". *Food Digestion* 2 (1–3) (2011): 23–5.
- [20] Minekus, M., M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu et al. "A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus". *Food & function* 5 (6) (2014): 1113–1124.
- [21] Brodkorb, A., L. Egger, M. Alminger. "INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion". *Nature Protocols* 14 (4) (2019): 991–1014.
- [22] Bogh, K. L., V. Barkholt, N. M. Rigby, E. N. Mills, C. B. Madsen. "Digested Ara h 1 loses sensitizing capacity when separated into fractions". *J. Agric. Food Chem.* 60 (11) (2012): 2934–2942.
- [23] Polovic, N., M. Blanusa, M. Gavrovic-Jankulovic, M. Atanaskovic-Markovic, L. Burazer, R. Jankov et al. "A matrix effect in pectin-rich fruits hampers digestion of allergen by pepsin in vivo and in vitro". *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37 (5) (2007): 764–71.
- [24] Polovic, N., A. Obradovic, M. Spasic, B. Plecas-Solarovic, M. Gavrovic-Jankulovic, T. Cirkovic Velickovic. "In vivo digestion of a thaumatin-like kiwifruit protein in rats". *Food Digestion* 1 (1–2) (2010): 5–13.
- [25] Polovic, N. D., R. V. Pjanovic, L. M. Burazer, S. J. Velickovic, R. M. Jankov, T. D. Cirkovic Velickovic. "Acid-formed pectin gel delays major incomplete kiwi fruit allergen Act c 1 proteolysis in in vitro gastrointestinal digestion". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (1) (2009): 8–14.
- [26] Cirkovic Velickovic, T. D., D. J. Stanic-Vucinic. "The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17 (1) (2018): 82–103.
- [27] Tantoush, Z., L. Mihajlović, B. Kravić, J. Ognjenović, R. M. Jankov, T. C. Veličković et al. "Digestibility of  $\beta$ -lactoglobulin following cross-linking by *Trametes versicolor* laccase and apple polyphenols". *Journal of the Serbian Chemical Society* 76 (6) (2011): 847–855.
- [28] Tantoush, Z., D. Apostolovic, B. Kravic, I. Prodic, L. Mihajlovic, D. Stanic-Vucinic et al. "Green tea catechins of food supplements facilitate pepsin digestion of major food allergens, but hampers their digestion if oxidized by phenol oxidase". *Journal of Functional Foods* 4 (3) (2012): 650–660.



- 
- [29] Stanic-Vucinic, D., M. Stojadinovic, M. Atanaskovic-Markovic, J. Ognjenovic, H. Grönlund, M. van Hage et al. “Structural changes and allergenic properties of  $\beta$ -lactoglobulin upon exposure to high-intensity ultrasound”. *Molecular Nutrition and Food Research* 56 (12) (2012): 1894–1905.
- [30] Tantoush, Z., D. Stanic, M. Stojadinovic, J. Ognjenovic, L. Mihajlovic, M. Atanaskovic-Markovic et al. “Digestibility and allergenicity of  $\beta$ -lactoglobulin following laccase-mediated cross-linking in the presence of sour cherry phenolics”. *Food chemistry* 125 (1) (2011): 84–91.
- [31] Stojadinovic, M., J. Radosavljevic, J. Ognjenovic, J. Vesic, I. Prodic, D. Stanic-Vucinic et al. “Binding affinity between dietary polyphenols and beta-lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed”. *Food chemistry* 136 (3–4) (2013): 1263–1271.
- [32] Apostolovic, D., D. Stanic-Vucinic, H. H. de Jongh, G. A. de Jong, J. Mihailovic, J. Radosavljevic et al. “Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity”. *Sci. Rep.* 6 (2016): 29249.
- [33] Radibratovic, M., A. Al-Hanish, S. Minic, M. Radomirovic, M. Milcic, D. Stanic-Vucinic et al. “Stabilization of apo alpha-lactalbumin by binding of epigallocatechin-3-gallate: Experimental and molecular dynamics study”. *Food chemistry* 278 (2019): 388–395.
- [34] Al-Hanish, A., D. Stanic-Vucinic, J. Mihailovic, I. Prodic, S. Minic, M. Stojadinovic et al. “Noncovalent interactions of bovine  $\alpha$ -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate”. *Food Hydrocolloids* 61 (2016): 241–250.