

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње **Фаизе Зафар**, мастер биохемчара, под насловом “Развој *in vitro* модела за процену сензитизације протеина хране”/ “Development of an *in vitro* model for assessing the sensitization of food proteins”.

1. Научна област: Хемијске науке
Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације обухвата испитивање молекулских и ћелијских механизма који леже у основи епителне сензитизације на алергене хране, са циљем доприноса развоју поузданих *in vitro* алата за процену и предвиђање алергености нових намирница. Истраживање се реализује у оквиру пројекта Marie Skłodowska-Curie Actions докторске мреже ALLPreT (Allergenicity Prediction Toolbox for Novel Foods), чији је примарни циљ унапређење стратегија за процену алергеног ризика нових и модификованих извора протеина пре њиховог пласирања на тржиште.

Алергени хране и неалергенски дијететски протеини користе се као модел-биомакромолекули за систематско испитивање њихових ефеката на активацију епитела, трансепителни транспорт и интегритет интестиналне баријере. Хумане интестиналне епителне ћелијске линије (Caco-2 и T84), култивисане на transwell уметцима, служиће као поједностављени, али функционално релевантни *in vitro* модели интестиналне баријере за проучавање раних молекулских и ћелијских догађаја који настају након контакта са дијететским протеинима.

Ови иницијални догађаји препознају се као кључни у раној фази сензитизације на храну, током које епителне ћелије не делују искључиво као физичка баријера, већ активно учествују у обликовању имунског одговора кроз регулацију баријерне функције и секрецију имуномодулаторних медијатора.

Поред тога, у оквиру истраживања биће примењена *in vitro* гастроинтестинална дигестија коришћењем стандардизованог INFOGEST статичког протокола, укључујући моделе који симулирају дигестију одраслих и старијих особа, у циљу што верније репродукције физиолошки релевантних услова варења. Сирови и термички обрађени кикирики биће подвргнути *in vitro* дигестији пре експозиције епителним ћелијама, како би се испитало на који начин гастроинтестинална разградња и технолошка обрада утичу на структурни интегритет, трансепителни транспорт и алергенски потенцијал протеина кикирикија.

Овај експериментални приступ омогућиће процену ефеката пептида насталих током дигестије и улоге матрикса хране у модулацији епителне активације, нарушавању баријерне функције и иницирању каскадних имуносигнализационих путева.

Транспорт протеина кроз епителни слој биће квантификован применом ELISA методе. Активација епителних ћелија пратиће се анализом експресије и секреције проинфламаторних цитокина, укључујући епителне алармине (IL-1 β , IL-25, IL-33 и

TSLP). Интегритет конфлуентних епителних монослојева биће оцењен имунофлуоресцентном детекцијом протеина чврстих ћелијских веза и мерењем трансепителне електричне резистенције (TEER).

Интеграцијом ових приступа, истраживање има за циљ идентификацију дискриминаторних биомаркера који на нивоу епителне баријере поуздано разликују алергене од неалергених протеина.

3. Основе хипотезе

Алергија на храну представља све израженији изазов за јавно здравље, погађајући више од 220 милиона људи широм света. Клиничке манифестације варирају — од благих оралних симптома до тешке, по живот опасне анафилаксе [1].

Убрзани развој одрживих, климатски отпорних и алтернативних извора протеина (попут инсеката, алги и биљних замена за месо) намеће потребу за поузданим и предиктивним алатима за процену алергености. Такви алати су кључни за потврду безбедности нових намирница пре њиховог пласирања на тржиште, у складу са регулаторним оквиром Европске уније који се односи на нову храну [2].

Ипак, постојеће стратегије процене алергености и даље не укључују валидиране, механистички засноване предиктивне моделе, посебно када је реч о процени потенцијала сензитизације нових и модификованих протеина [3].

Фаза сензитизације представља суштински предуслов за развој IgE-посредоване алергије на храну, јер обухвата иницијалне молекулске и ћелијске догађаје који се одвијају на нивоу епителних баријера [1].

Епителне ћелије интестиналне мукозе не делују искључиво као пасивна физичка препрека, већ имају активну имуномодулаторну улогу. Оне регулишу транспорт протеина, одржавају интегритет баријере и секретују цитокине и алармине који усмеравају и обликују даље имуне одговоре [4,5].

Ипак, упркос њиховом централном значају, механизми који управљају транспортом алергена кроз епителне баријере, као и процеси активације епителних ћелија протеинима хране, још увек нису у потпуности разјашњени. Додатно, кључни фактори који утичу на процес сензитизације — укључујући пут и дозу изложености, трајање излагања, ефекте дигестије и матрикса хране, технолошку обраду, као и специфичан епителни контекст — недовољно су интегрисани у постојеће приступе процени алергености хране [6].

Оквир пута нежељеног исхода (Adverse Outcome Pathway, AOP) за сензитизацију на храну препознаје поремећај интегритета епителне баријере и активацију епителних ћелија као кључне ране догађаје који иницирају развој алергијске сензитизације [7].

Истовремено, технолошка обрада хране и гастроинтестинална дигестија могу значајно променити конформацију протеина, изложеност епитопа и њихову биодоступност, чиме директно утичу на алергенски потенцијал дијететских протеина [8,9].

Полазна хипотеза подразумева да дигестија и обрада хране модификују алергенски потенцијал протеина, као и да се алергенски и неалергенски протеини разликују у способности да:

- пређу епителне баријере,
- активирају епителне сигналне путеве (нпр. NF-κB),
- индукују проинфламаторне и епителом посредоване цитокинске одговоре,
- наруше интегритет чврстих ћелијских веза.

Свеобухватна карактеризација ових раних епителних одговора омогућиће идентификацију поузданих, предиктивних маркера алергенског потенцијала и представљаће значајан корак ка развоју валидираних *in vitro* алата за процену алергености хране.

4. Циљеви истраживања и очекивани резултати

Научни циљеви ове докторске дисертације структурисани су кроз следеће истраживачке фазе:

- **Успостављање и оптимизација диференцираних *in vitro* модела интестиналног епитела**, коришћењем ћелијских линија Сасо-2 и Т84 као поједностављених, али физиолошки релевантних модела хуманог цревног епитела.
- **Примена INFOGEST статичког *in vitro* модела дигестије** (модел ораслих и старијих особа) на сирови и термички обрађени кикирики, у циљу добијања физиолошки релевантних продуката гастроинтестиналне разградње.
- **Компаративна анализа трансепителног транспорта** алергенских и неалергенских протеина кроз диференциране епителне монослојеве, ради процене њихове способности преласка епителне баријере.
- **Карактеризација епителне активације након излагања алергенима**, кроз квантификацију кључних цитокина (IL-1β, IL-25, IL-33 и TSLP), као и процену активације редокс-зависних сигналних путева.
- **Процена интегритета епителне баријере и структурног ремоделовања**, мерењем трансепителне електричне резистенције (TEER) и имунофлуоресцентном анализом протеина чврстих ћелијских веза.
- **Идентификација молекулских и ћелијских биомаркера** који поуздано разликују алергене од неалергенских протеина и поседују предиктивну вредност за епителни стрес, дисфункцију баријере и про-сензитизујуће имуносигнализационе процесе.

Очекивани резултати ове докторске дисертације обухватају развој робусног, механистички утемељеног *in vitro* модела интестиналног епитела, намењеног проучавању раних догађаја у процесу сензитизације на храну. Поред тога, очекује се идентификација поузданих биомаркера епителног порекла повезаних са алергенским потенцијалом протеина, као и генерисање експерименталних података који ће допринети унапређењу стратегија процене ризика од алергености нових намирница.

Добијени резултати представљаће научну основу за даљи развој предиктивних алата и пружиће значајан допринос активностима у оквиру ALLPreT пројекта.

5. Методе истраживања

Хумане интестиналне епителне ћелијске линије (Caco-2 и T84) биће култивисане на *transwell* уметцима у циљу формирања конфлуентних, поларизованих монослојева са функционалним чврстим међућелијским везама. Успостављање и очување интегритета баријере пратиће се мерењем трансепителне електричне резистенције (TEER), као и имунофлуоресцентним обележавањем структурних протеина међућелијских веза.

Трансепителни транспорт алергених и неалергених протеина процењиваће се квантификацијом њиховог проласка у базолатерални одељак, применом ELISA методе и имуноблота. Поред анализе појединачних протеина, сирови и термички обрађени кикирики биће подвргнути INFOGEST статичком *in vitro* моделу дигестије, у условима који симулирају гастроинтестиналну дигестију одраслих и старијих особа.

Добијени производи дигестије биће детаљно окарактерисани и нанесени на апикалну страну епителних монослојева, ради процене утицаја дигестијом и технолошком обрадом изазваних протеинских модификација на епителни транспорт, интегритет баријере и ћелијске одговоре на стрес.

Паралелно, епителни одговор на стрес биће анализиран мерењем нивоа унутарћелијских реактивних кисеоничних врста (ROS) и производње азот-оксида, чиме ће се пратити редокс-регулисани сигнални механизми опасности повезани са излагањем алергенима.

Активација епитела биће детаљно окарактерисана анализом генске експресије и секреције кључних цитокина (IL-1 β , IL-25, IL-33 и TSLP), који ће бити квантификовани на нивоу mRNA и протеина применом qPCR и ELISA методологије.

У циљу функционалне процене активације имунског система, базолатерални супернатанти добијени са епителних монослојева изложених алергенима биће примењени на диференциране THP-1 макрофаге, као модел интестиналних мијелоидних ћелија. Активација макрофага пратиће се мерењем ослобађања проинфламаторних цитокина, чиме ће се омогућити функционална евалуација интеракције између епителних и имуних ћелија након трансепителне транслокације алергена.

Интеграцијом ових комплементарних експерименталних приступа обезбедиће се механистичко разјашњење начина на који алергени, у поређењу са неалергеним протеинима, као и алергени модификовани дигестијом и матриksom хране, утичу на интегритет епителне баријере, сигнализацију стреса, секрецију цитокина и активацију имунског одговора. Овако добијени подаци пружиће добру научну основу за развој предиктивних *in vitro* алата за процену алергености хране у оквиру ALLPreT пројекта.

6. Литература

1. Garcia-Carmona, Y.; Curotto de Lafaille, M.A. Advances in Food Allergy Immunotherapy: Current Strategies and Role of Antibodies Isotypes. *Cells* 2025, 14.

2. Uddin, M.J.; Saeed, S.M.; Hussain, S.B.; Dina, A.A.; Upoma, N.J. Safety and Regulatory Frameworks for Unconventional Food Sources. *Dietary, Sensory and Gastronomic Applications: Exploring Unconventional Food Sources Volume 2* **2026**, *2*, 719–745, doi:10.1016/B978-0-443-33345-3.00038-9.
3. Smits, M.; Nooijen, I.; Redegeld, F.; de Jong, A.; Le, T.M.; Knulst, A.; Houben, G.; Verhoeckx, K. Digestion and Transport across the Intestinal Epithelium Affects the Allergenicity of Ara h 1 and 3 but Not of Ara h 2 and 6. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, doi:10.1002/mnfr.202000712.
4. Anania, C.; Cuomo, B.; D’Auria, E.; Decimo, F.; Indirli, G.C.; Manca, E.; Mondì, F.; Pendezza, E.; Sartorio, M.U.A.; Calvani, M. Intestinal Barrier Dysfunction and Food Allergy. *Italian Journal of Pediatric Allergy and Immunology* **2024**, *38*, 22–35, doi:10.53151/2531-3916/2024-352.
5. Niewiem, M.; Grzybowska-Chlebowczyk, U. Intestinal Barrier Permeability in Allergic Diseases. *Nutrients* **2022**, *14*.
6. Cochrane, S.; Beyer, K.; Clausen, M.; Wjst, M.; Hiller, R.; Nicoletti, C.; Szepfalusi, Z.; Savelkoul, H.; Breiteneder, H.; Manios, Y.; et al. Factors Influencing the Incidence and Prevalence of Food Allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2009**, *64*, 1246–1255.
7. Lozano-Ojalvo, D.; Benedé, S.; Antunes, C.M.; Bavaro, S.L.; Bouchaud, G.; Costa, A.; Denery-Papini, S.; Diaz-Perales, A.; Garrido-Arandia, M.; Gavrovic-Jankulovic, M.; et al. Applying the Adverse Outcome Pathway (AOP) for Food Sensitization to Support in Vitro Testing Strategies. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *85*, 307–319, doi:10.1016/J.TIFS.2019.01.014.
8. Ozyurek-Arpa, F.; Yaman, M.; Çakır, B.; Kalkan, I. Impact of Thermal and Biotechnological Processing on the Bioaccessibility and Allergenic Peptide Profile of White Lupin (*Lupinus Albus*). *Front. Nutr.* **2026**, *12*, doi:10.3389/fnut.2025.1757989.
9. Pang, L.; Liu, M.; Li, X.; Guo, L.; Man, C.; Yang, X.; Jiang, Y. Effect of Enzymatic Hydrolysis Combined with Processing on Allergenicity of Food Allergens. *Trends Food Sci. Technol.* **2024**, *143*, 104248, doi:10.1016/j.tifs.2023.104248.