

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Nevena D. Zelenović

**„Ispitivanje interakcija sekundarnih
metabolita elaginske kiseline (urolitina) sa
albuminima i ekstracelularnim vezikulama“**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

University of Belgrade

Faculty of Chemistry

Nevena D. Zelenović

„Examination of interactions of ellagic acid's secondary metabolites (urolithins) with albumins and extracellular vesicles“

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

Mentori:

dr Milica Popović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet,

dr Milica Kojadinović, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu-Institut za medicinska istraživanja-

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,

Članovi Komisije:

dr Natalija Polović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet,

dr Radivoje Prodanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet,

dr Bojan Bondzić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu- Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju-

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,

Datum odbrane:

Zahvalnica

Lista skraćenica i akronima

AD - Alchajmerova bolest (*engl.* Alzheimer's disease)
AFM - mikroskopija atomskih sila (*engl.* atomic force microscopy)
ARE - element antioksidativnog odgovora (*engl.* antioxidant response element)
BBB - krvno-moždana barijera (*engl.* blood-brain barrier)
BSA - albumin iz goveđeg seruma (*engl.* Bovine Serum Albumin)
CD - cirkularni dihiroizam (*engl.* circular dichroism)
COX2 - ciklooksigenaze 2 (*engl.* cyclooxygenase 2)
DDS - sistem za isporuku lekova nanorazmera (*engl.* nanoscale drug delivery system)
DLS - dinamičko rasipanje svetlosti (*engl.* dynamic light scattering)
DMEM - hranljivi modifikovani medijum (*engl.* Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO - dimetil sulfoksid (*engl.* dimethyl sulfoxide)
DSS - natrijum dekstran sulfat (*engl.* dextran sodium sulphate)
EA - elaginska kiselina (*engl.* elagic acid)
ET - elagitanini (*engl.* ellagitannins)
EV - ekstracelularna vezikula (*engl.* extracellular vesicle)
FBS - fetalni goveđi serum (*engl.* fetal bovine serum)
FDA - Agencija za hranu i lekove (*engl.* Food and Drug Administration)
FTIR - infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (*engl.* Fourier transform infrared spectroscopy)
GRAS - generalno prepoznat kao bezbedan (*engl.* Generally Recognized as Safe)
GOLD - Genetska optimizacija za doking liganda (*engl.* Genetic Optimization for ligand docking)
GT - galotanini (*engl.* gallotannins)
HEK 293 - ćelije ljudskog embriona bubrega (*engl.* human embryonic kidney 293 cells)
HSA - albumin iz humanog seruma (*engl.* human serum albumin)
IBD - inflamatorna bolest creva (*engl.* inflammatory bowel disease)
IL - interleukin (*engl.* interleukin)
LC-MS - tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (*engl.* liquid chromatography - mass spectrometry)
MetS - metabolički sindrom (*engl.* metabolic syndrome)
MRE - prosečni elepticitet po aminokiselinskom ostatku (*engl.* mean residue ellipticity)
MS - multipla skleroza (*engl.* multiple sclerosis)
MVB - multivezikularna tela (*engl.* multivesicular body)
MWCO - granična molekulska masa (*engl.* molecular weight cut-off)
Nrf2 - nuklearni faktor eritroid 2 - sličan faktoru 2 (*engl.* nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
NTA - analiza praćenja nanočestica (*engl.* nanoparticle tracking analysis)
PBS - fiziološki rastvor puferisan fosfatom (*engl.* phosphate-buffered saline)
PDB - proteinska banka podataka (*engl.* Protein Data Bank)
PEG - polietilen glikol (*engl.* polyethylene glycol)
PP - polipropilen (*engl.* polypropylene)
PVDF - polivinil difluorid (*engl.* polyvinylidene difluoride)
RMSD - srednja kvadratna devijacija (*engl.* root mean square deviation)
ROS - reaktivna kiseonična vrsta (*engl.* reactive oxygen species)

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija (*engl. scanning electron microscopy*)
SFS - sinhrona fluorescentna spektroskopija (*engl. synchronous fluorescence spectroscopy*)
SV - Stern-Volmer
TEM - transmisiona elektronska mikroskopija (*engl. transmission electron microscopy*)
TNF α - faktor nekroze tumora α (*engl. tumor necrosis factor α*)
UM - urolitin metabotip (*engl. urolithin metabotype*)
URO - urolitini (*engl. urolithins*)
UV/VIS - ultraljubičasta/vidljiva svetlost (*engl. ultraviolet/visible light*)
VHH - varijabilni teški domen teškog lanca (*engl. variable heavy domain of heavy chain*)

Ispitivanje interakcija sekundarnih metabolita elaginske kiseline (urolitina) sa albuminima i ekstracelularnim vezikulama

Sažetak

Urolitini (URO) su sekundarni metaboliti elaginske kiseline nastale u digestivnom traktu pod dejstvom crevne flore na hranu bogatu elagitaninima. Zbog svoje lipofilne strukture URO prolaze biološke barijere i na taj način dospevaju u cirkulaciju. U cirkulaciji se nalaze u vidu konjugata sa glukuronskom kiselinom ili se vezuju za albumine kako bi se transportovali do tkiva u kojima ispoljavaju antioksidativnu, antiinflamatornu i antikancersku aktivnost.

U doktorskoj disertaciji je ispitivano vezivanje urolitina, kao i njihovih glukuronida za serumske albumine kao proteinske nosače metodom fluorescentne spektroskopije. Mehanizam gašenja fluorescencije i konstante vezivanja (K_b) određeni su titracijom rastvora proteina fiksne koncentracije različitim koncentracijama liganda uz merenje intenziteta fluorescencije. Variranjem temperature izračunati su termodinamički parametri interakcija. Promene sekundarnih struktura proteina su praćene primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom i cirkularnim dihiroizmom. Rezultati spektroskopskih analiza su upotpunjeni molekulskim dokingom kojim su predviđena mesta vezivanja URO za serumske albumine. Dobijeni rezultati omogućili su bolje razumevanje mehanizma vezivanja i transporta, odnosno farmakodinamiku ovih biološki aktivnih jedinjenja. U ovoj disertaciji su ispitivane i metode inkorporacije URO A, predstavnika klase urolitina, u ekstracelularne vezikule (EV) dobijene iz komercijalnih humanih ćelijskih linija. Ekstracelularne vezikule predstavljaju dobre neproteinske nanonosače zbog svoje veličine, strukture i mogućnosti prolaska različitih bioloških barijera. Značaj inkorporacije URO A u EV je ciljani transport, kao i zaštita ovih jedinjenja od oksidacije i konjugacije u cirkulaciji.

Ključne reči: humani serum albumin, goveđi serum albumin, urolitin, protein-ligand interakcije, spektrofotometrija, molekulski doking, ekstracelularne vezikule

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Examination of interactions of ellagic acid's secondary metabolites (urolithin) with albumins and extracellular vesicles

Abstract

Urolithins (UROs) are secondary metabolites of ellagic acid, formed in the digestive tract by the action of intestinal flora on ellagitannin-rich foods. Due to their lipophilic structure, UROs can cross biological barriers and enter circulation. In circulation, UROs exist as conjugates with glucuronic acid or sulfates or bind to albumins. Albumins facilitate their transport to tissues, where they exhibit antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer activities.

The binding of urolithins and their glucuronides to serum albumins, as protein carriers, was investigated in this doctoral dissertation using fluorescence spectroscopy. The fluorescence quenching mechanisms and binding constants (K_b) were determined by titrating a fixed-concentration protein solution with varying ligand concentrations and measuring fluorescence intensity. By varying the temperature, the thermodynamic parameters of the interactions were calculated. Changes in the secondary structure of proteins were monitored using Fourier-transform infrared spectroscopy and circular dichroism. The results of spectroscopic analyses were complemented by molecular docking, which predicted the binding sites of UROs on serum albumins. These findings contribute to a better understanding of the binding and transport mechanisms, as well as the pharmacodynamics of these biologically active compounds. Furthermore, this dissertation explored methods for incorporating URO A, a representative of the urolithin class, into extracellular vesicles (EVs) derived from commercial human cell lines. EVs are promising non-protein nanocarriers due to their size, structure, and ability to traverse various biological barriers. The incorporation of URO A into EVs is significant for achieving targeted delivery and protecting these compounds from oxidation and conjugation during circulation.

Keywords: human serum albumin, bovine serum albumin, urolithin, protein-ligand interactions, fluorescence spectroscopy, molecular docking, extracellular vesicles

Scientific field: Chemistry

Subfield: Biochemistry

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	4
2.1. Elagitanini i elaginska kiselina.....	5
2.2. Klase urolitina i metabotipovi	5
2.3. Mehanizam dejstva urolitina A	8
2.4. Biološka uloga urolitina A	9
2.5. Serumski albumini kao nosači urolitina	11
2.6. Metode za proučavanje protein-ligand interakcija.....	13
2.6.1. UV/VIS spektroskopija	14
2.6.2. Fluorescentna spektroskopija	15
a) Principi metode	15
b) Mehanizmi gašenja fluorescencije.....	15
c) Stern-Volmerova konstanta gašenja fluorescencije.....	16
d) Izračunavanje termodinamičkih parametara protein-ligand interakcija	16
2.6.3. Sinhrona fluorescentna spektroskopija.....	17
2.6.4. CD spektroskopija	17
2.6.5. IR spektroskopija.....	18
2.6.6. Molekulski doking.....	18
2.7. Sistemi za dostavu bioaktivnih jedinjenja	19
2.7.1. Biološka uloga i terapijski potencijal ekstracelularnih vezikula	21
2.7.2. Uloga ekstracelularnih vezikula u dostavi bioaktivnih jedinjenja.....	23
2.7.3. Metode izolovanja ekstracelularnih vezikula	23
2.7.4. Metode inkorporacije biološki aktivnih jedinjenja u ekstracelularne vezikule	27
a) Pasivna inkorporacija.....	27
b) Aktivna inkorporacija	28
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	31
4. MATERIJAL I METODE	33
4.1. Materijal	34
4.2. Metode.....	34
4.2.1. Merenje gašenja fluorescencije SA	34
4.2.2. Stern-Volmerova (SV) i modifikovana Stern-Volmerova (SV) jednačina	35
4.2.3. Termodinamički parametri HSA-URO kompleksa	36
4.2.4. Merenje sinhronih fluorescentnih spektara HSA-URO kompleksa	37
4.2.5. Snimanje FT-IR spektara HSA-URO kompleksa	37
4.2.6. Snimanje CD spektara HSA-URO A kompleksa	37
4.2.7. Molekulski doking BSA-URO kompleksa.....	38
4.2.8. Molekulski doking HSA-URO kompleksa.....	38

4.2.9. Statistička analiza	39
4.3. Inkorporacija URO A u EV	39
4.3.1. Gašenje HEK 293 ćelija.....	39
4.3.2. Prečišćavanje EV iz medijuma ćelijske kulture HEK 293	40
4.3.3. Priprema rastvora i snimanje UV spektra urolitina A	40
4.3.4. Punjenje EV sa URO A	41
4.3.5. LC-MS analiza ekstrahovanog URO A.....	42
5. REZULTATI.....	43
5.1. Gašenje unutrašnje fluorescencije serumskih proteina urolitinima.....	45
5.1.1. Gašenja unutrašnje fluorescencije BSA	45
5.1.2. Gašenja unutrašnje fluorescencije HSA	48
5.2. Stern-Volmerov dijagram i konstante <i>HSA-URO kompleksa</i>	52
5.3. Konstante vezivanja i broj vezivnih mesta u HSA.....	55
5.4. Termodinamički parametri HSA-URO kompleksa	57
5.5. Sinhroni fluorescentni spektri HSA-URO kompleksa	59
5.6. FTIR spektri HSA-URO kompleksa	62
5.7. CD spektri HSA-URO A kompleksa	63
5.8. Molekulski doking serum albumina i urolitina	64
5.8.1. Molekulski doking BSA-URO kompleksa	64
5.8.2 Molekulski doking HSA-URO kompleksa	68
5.9. Analiza URO A izolovanog iz vezikula	76
6. DISKUSIJA	78
7. ZAKLJUČCI.....	83
8. LITERATURA.....	85
9. PRILOG.....	97
10. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM	102
11. IZJAVE.....	105

1. UVOD

Urolitini (URO) su sekundarni metaboliti elaginske kiseline koja nastaje u crevnom traktu metabolizmom hrane bogate elagitaninima kao što su: nar, jagode, maline, orašasti plodovi i vina. Svi URO u osnovi imaju dibenzopiran-6-on jezgro koje se razlikuje u stepenu hidroksilne supstitucije. Dobijeni URO su benzokumarini, lipofilne prirode, što im omogućava prolazak kroz bioloske membrane i ulazak u cirkulaciju. Urolitini se u plazmi nalaze u mirkomolarnim koncentracijama i to u vidu konjugata sa glukuronskom kiselinom ili sa sulfatima. Najzastupljeniji među njima su urolitin A i njegovi konjugati. U cirkulaciji urolitini nisu slobodni već su u vidu konjugata ili se vezuju za proteine plazme, albumine, koji im omogućavaju transport do ciljnih tkiva. Nakon što dospeju u tkivo dolazi do dekonjugacije, odnosno do uklanjanja glukuronida i sulfata sa URO. Urolitini su tek tada spremni da ispolje svoje raznovrsne biološke aktivnosti, među kojima su antioksidativna, antiglikativna, antiinflamatorna i antikancerska aktivnost.

Najveću biološku aktivnost ispoljava URO A koja se ogleda u stimulisanju autofagije u disfunkcionalnim mitohondrijama. Ovaj proces je poznat kao mitofagija i ogleda se u selektivnom uklanjanju oštećenih ili disfunkcionalnih mitohondrija iz ćelija. To je ključni mehanizam za održavanje funkcionalnosti ćelije. Zbog ovog svojstva prečišćeni URO A je iskorišćen za proizvodnju suplementa pod nazivom Mitopure, koji je odobren za humanu upotrebu od Američke agencije za hranu i lekove (*engl.* Food and Drug Administration, FDA). Mitopure je dizajniran da obezbedi direktan unos urolitina A zaobilazeći zavisnost od mikrobioma creva. Kliničke studije su pokazale da ima važnu ulogu u prevenciji dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih oboljenja.

Poznato je da jedinjenja polifenolne prirode, kakvi su urolitini, reaguju sa serumskim proteinima. Serumski albumini su ključni solubilni proteini u cirkulaciji uključeni u transport različitih jedinjenja. Goveđi serumski albumin (*engl.* bovine serum albumin, BSA) ima oko 80% homologije sekvence i strukturne sličnosti sa humanim serumskim albuminom (*engl.* human serum albumin, HSA). Njihova velika zastupljenost u plazmi može uticati na biodostupnost i bioaktivnost molekula kakvi su URO. Oba proteina predstavljaju model sisteme za ispitivanje protein-ligand interakcija.

Priroda interakcija koje se ostvaruju između serumskih albumina i URO može se ispitati spektroskopskim metodama. Najčešće se primenjuje fluorescentna spektroskopija zbog prirodne fluorescencije koju ova dva proteina poseduju. Prirodna fluorescencija potiče od aromatičnih aminokiselinskih ostataka u vezivnom mestu. Vezivanjem liganda za ova mesta dolazi do promene intenziteta unutrašnje fluorescencije. Sinhronom fluorescentnom spektroskopijom se može utvrditi za koje od tih mesta se vezuje ligand. Prilikom vezivanja liganda može doći do narušavanja strukture proteina i to najčešće sekundarnih struktura. Ove promene se prate spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom sa Fourierovom transformacijom i cirkularnim dihroizmom. Molekulski doking upotpunjuje rezultate spektroskopskih metoda i pruža informacije o vezivnim mestima kao i interakcijama koje se u njima ostvaruju. Veze koje se formiraju između molekula urolitina i proteina su obično višestruke, uključujući: vodonične veze, elektrostatičke veze, hidrofobne interakcije i van der Waalsove interakcije. Poznavanje mehanizma vezivanja URO za serumske proteine nam daje uvid u biodistribuciju urolitina između proteina i uključenosti u određenu fiziološku aktivnost.

Prethodnih decenija predmet istraživanja su postali prirodni nanonosači biološki aktivnih jedinjenja. Zbog svoje biokompatibilnosti, niske imunogenosti i sposobnosti da prelaze različite biološke membrane, uključujući i krvno-moždanu, izdvojile su se ekstracelularne vezikule. Proizvedene su od strane različitih vrsta ćelija kako bi obavljale međućelijsku komunikaciju. Ove vezikule mogu nositi proteine, lipide, nukleinske kiseline i male molekule, kao što su antioksidansi.

Zahvaljujući svojoj membranskoj strukturi EV mogu zaštititi osetljiva jedinjenja poput URO od oksidacije ili konjugacije u cirkulaciji i omogućiti im ciljanu dostavu do određenih ćelija ili tkiva. Zato je neophodno pronaći adekvatne metode inkorporacije URO u EV kako bi i biološki aktivna jedinjenja i same vezikule ostale intaktne. Sva navedena svojstva čine EV izuzetno pogodnim za razvoj sistema nano-razmera za dostavu lekova u terapiji raznih bolesti, uključujući neurodegenerativne, kardiovaskularne i onkološke.

2. OPŠTI DEO

2.1. Elagitanini i elaginska kiselina

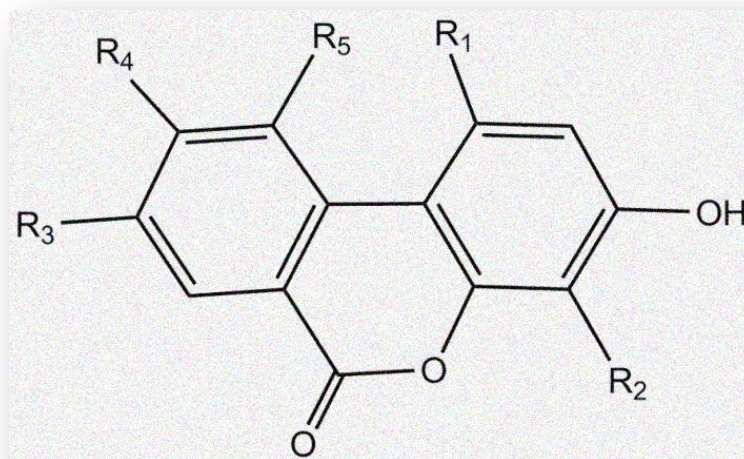
Pozitivni efekti konzumacije voća i povrća zavise od sinergijskih efekata brojnih bioaktivnih komponenti koje su prisutne u njima, kao što su: vlakna, vitamini, minerali i polifenolna jedinjenja. Polifenoli privlače posebnu pažnju zbog svoje sposobnosti da utiču na metabolizam lipida i glukoze. Pored flavonoida i nekoliko neflavonoidnih polifenolnih jedinjenja kao što su resveratrol iz grožđa, kurkumin iz kurkume i elaginska kiselina iz voća, imaju povoljan uticaj na zdravlje ljudi. Elaginska kiselina se može naći u bobičastom voću (jagode i maline), orašastim plodovima (orasi, pistači, indijski orah, žir i pekan), šipku i grožđu, i to u obliku elagitanina koji čine 60% do 80% ukupnih prisutnih fenolnih jedinjenja [1].

Elaginska kiselina (2,3,7,8-tetrahidroksi[1]-benzopiranol[5,4,3-cde]benzopiran-5,10-dion) je neflavonoidno polifenolno jedinjenje koje poseduje i lipofilni deo sa četiri 6-člana ugljovodonična prstena i hidrofilni deo sa četiri hidroksilne grupe i dve laktonske grupe. Ova jedinstvena struktura čini EA sposobnom da prihvati elektrone sa različitih supstrata čime učestvuje u antioksidativnim redoks reakcijama. Elaginska kiselina je prisutna u nekoliko oblika: slobodna, glikozilovana i/ili acilovana, ili u vidu polimera elagitanina (ET). Elagitanini mogu biti hidrolizovani spontano oslobađajući EA [2, 3]. Mesta apsorpcije slobodne EA prisutne u cirkulaciji su ili želudac ili tanko crevo. Mali deo slobodne EA iz ishrane se apsorbuje u želucu, jer su ET otporni na kiselu hidrolizu i na razgradnju u želucu. Zato se hidroliza ET i oslobađanje EA dešava u tankom crevu pri neutralnom do blago baznom pH. Deo oslobođene EA se apsorbuje u tankom crevu. Smatra se da se proces preuzimanja EA odvija pasivnom difuzijom koju pokreće gradijent koncentracije pri čemu još nisu identifikovani specifični transporter koji olakšavaju unos EA preko epitela creva [4, 5]. Elagitanini i oslobođena EA imaju nisku bioraspoloživost i shodno tome ne mogu da dospeju u sistemsku cirkulaciju u značajnim koncentracijama. Pokazano je da povećanje unosa ET ne dovodi do povećanja količine EA u cirkulaciji [6].

2.2. Klase urolitina i metabotipovi

I ET i EA uglavnom dospevaju do debelog creva gde pod uticajem crevne mikrobiote u velikoj meri bivaju transformisani do 6H-dibenzo[b,d]piran-6-one derivata poznatih kao urolitini (URO). Urolitini su klasa organskih jedinjenja koja sadrže benzokumarinski skelet (**slika 1**). Oni čine celu metaboličku porodicu koja se proizvodi u intestinalnom traktu otvaranjem i dekarboksilacijom jednog od laktonskih prstena elaginske kiseline i sekvencijalnim uklanjanjem hidroksilne grupe sa različitih pozicija.

Put formiranja URO nakon dekarboksilacije kreće od pentahidroksi-urolitina (URO M5). Ovo jedinjenje je prekursor za nekoliko tetrahidroksi-urolitinskih izomera nastalih uklanjanjem jedne hidroksilne grupe sa različitih pozicija (URO D, URO E i URO M6). Trihidroksi-urolitini (URO C i URO M7) nastaju uklanjanjem druge hidroksilne grupe, a dihidroksi-urolitini (URO A i izo-URO A) nakon uklanjanja treće hidroksilne grupe. Monohidroksi-urolitin (urolitin B) nastaje samo nakon što je već nastao izourolitin A [7]. U **tabeli 1** su prikazani različiti R ostaci u zavisnosti od tipa urolitina [8].



Slika 1. Zajednička struktura urolitina

Tabela 1. Različiti R ostaci u zavisnosti od tipa urolitina [8]

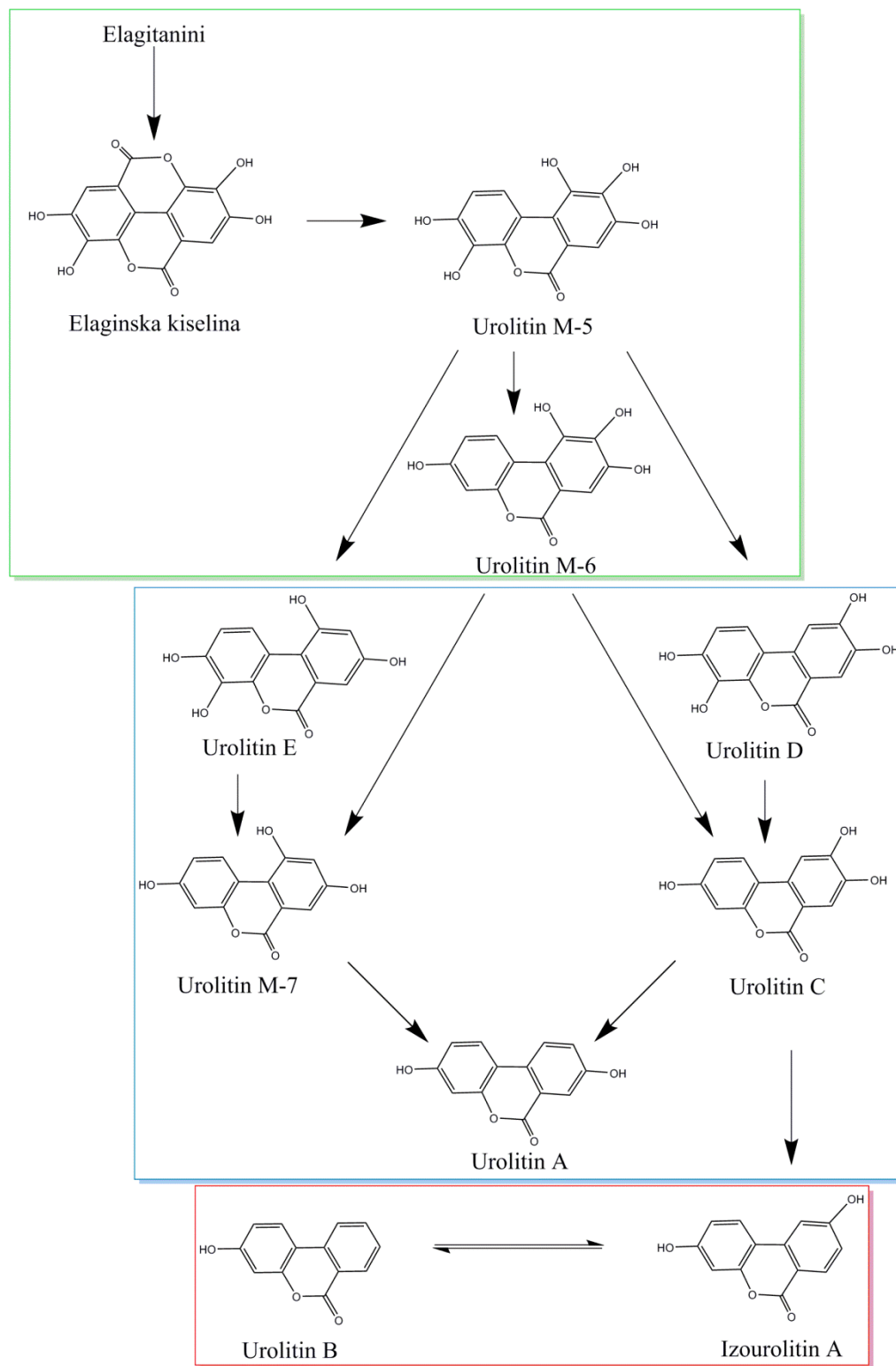
Urolitin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Luteinska kiselina	COOH	OH	OH	OH	OH
URO M5	H	OH	OH	OH	OH
URO M6	H	H	OH	OH	OH
URO M7	H	H	OH	H	OH
URO A	H	H	OH	H	H
URO B	H	H	H	H	H
URO C	H	H	OH	OH	H
URO D	H	OH	OH	OH	H
Izo-URO A	H	H	H	OH	H

Postoji konzistentna interindividualna varijabilnost u metabolizmu ET kod ljudi, što dovodi do takozvanih URO metabotipova (UM) povezanih sa crevnom mikrobiotom. Tri UM su dobro definisana u zavisnosti od proizvedenih URO (slika 2):

- i) metabotip A (UM-A) kada se samo URO A proizvodi kao konačni URO,
- ii) metabotip B (UM-B) koji daje URO B i izoURO A, pored URO A
- iii) metabotip 0 (UM-0) čiji pojedinci ne proizvode ove konačne URO [9].

Interakcija između (poli)fenola i mikrobioma creva funkcioniše na dva načina. Jedan način je da mikrobiota utiče na proizvodnju metabolita, kao i iskorišćenje (poli)fenola, dok je drugi način modulacija mikrobne populacije pojedinca. Subpopulacija UM-0 može da se promeni u UM-A ili UM-B nakon dugotrajne i/ili visoke izloženosti ET ili EA [10]. Osobe koje su metabolički zdrave (tj. bez stanja metaboličkog sindroma) oslobađaju veće koncentracije aktivnog URO A i pripadaju UM-A. U slučaju da osoba ima neki metabolički poremećaj, onda ona proizvodi minimalno ili nimalo URO A i

oslobađa manje aktivne oblike URO uključujući izo-URO A i URO B, tako da pripadaju UM-0, odnosno UM-B [11].



Slika 2. Šematski prikaz kataboličkog puta elaginske kiseline i odgovarajući metabotipovi urolitina: metabotip 0 (zelena boja), metabotip A (plava boja) i metabotip B (crvena boja).

Poslednjih godina u fecesu coveka nakon konzumiranja nara identifikovana su četiri nova URO: 4,8,9,10-tetrahidroksi-URO (URO M6R), 4,8,10-trihidroksi-URO (URO M7R), 4,8,9-trihidroksi-URO (URO-R) i 4,8-dihidroksi-URO (URO AR). Za proizvodnju ovih novih metabolita potrebna je aktivnost bakterijske 3-dehidroksilaze. Konjugati II faze metabolizma ovih URO su otkriveni u urinu [12].

Urolitini (u niskom mikromolarnom opsegu), uglavnom u formi konjugata II faze metabolizma, cirkulišu u krvotoku i dospevaju u ciljna tkiva. Zbog toga su *Cerda i saradnici* 2005. godine predložili URO kao „kariku koja nedostaje“ kako bi objasnili paradoksalno nisku bioraspoloživost ET i zdravstvene benefite opisane pri konzumiranju hrane bogate ET. Koncentracije URO u krvnoj plazmi kreću se u opsegu 0,003 - 5,2 μM i u urinu do 50 μM . Prisustvo URO je karakteristično i za mleko majki koje konzumiraju orahe kao dijetetski izvor ET. Ukupna koncentracija URO u mleku se kreće od 8,5 do 176,9 nM, od kojih preovlađuju konjugati URO. Sve ovo je podstaklo još veće interesovanje za URO poslednjih godina, posebno za URO A kao predstavnika klase [9].

2.3. Mehanizam dejstva URO A

URO A pripada porodici urolitina za koje je karakteristično α -benzo-kumarinsko jezgro. URO A nastaje u debelom crevu dejstvom mikroba na ET i EA. Bakterije odgovorne za konverziju elaginske kiseline u URO A u digestivnom traktu su *Gordonibacter urolithinfaciens* i *Gordonibacter pamelaee*. Prisutnost bakterija roda *Gordonibacter* u digestivnom traktu varira u zavisnosti od starosti, zdravstvenog stanja i ishrane osobe. Konverzija prekursora do URO A se ne javlja kod svih pojedinaca, već samo kod 40% starije ljudske populacije. [11]. Proizvedeni URO A je stabilniji u organizmu i lakše se apsorbuje u cirkulaciji u poređenju s drugim urolitinima. To čini URO A najprisutnijom vrstom urolitina u cirkulaciji i tkivima [13]. Nakon što nastane i apsorbuje se u krvotok, URO A dospeva do jetre gde prolazi kroz II fazu metabolizma gde se formiraju konjugati URO A. Među njima u ljudskoj plazmi najzastupljeniji su URO A-glukuronid i URO A-sulfat u rasponu koncentracija od 0,024 do 35 μM . Biološka uloga konjugata URO A *in vivo* još uvek nije razjašnjena, a dosadašnji *in vitro* eksperimenti pokazuju da konjugati URO A imaju niže biološke aktivnosti u poređenju sa nekonjugovanim formom URO A [11].

Direktna suplementacija sa URO A zaobilazi konverziju prekursora URO A koja je posredovana mikrobiomom. Kada se apsorbuje, URO A pozitivno utiče na funkciju mitohondrija kod stanja koja se povezuju sa starenjem. Tada dolazi do selektivnog procesa autofagije, odnosno mitofagije, koja predstavlja recikliranje disfunkcionalnih mitohondrija. Mitofagija se javlja kada su mitohondrije oštećene. URO A može aktivirati proces na dva načina. URO A aktivira PINK1-Parkin posredovanu mitofagiju stabilizacijom kinaze PINK1. Parkin se zatim regrutuje od strane PINK1 i ubikvitinira mitohondrijalne proteine. Ubikvitinski lanci su zauzvrat fosforilisani od strane PINK1, što dovodi do akumulacije fosfo-ubikvitiniranih mitohondrijalnih proteina. Oni služe kao mesta za spajanje adapterskih proteina, (optineurin i p62) koji zatim vezuju LC3. URO A aktivira PINK1-Parkin nezavisni put mitofagije povećavajući količinu mitohondrijalnog BNIP3 proteina koji direktno regrutuje LC3, nezavisno od Parkin proteina. Kod oba puta, LC3 omogućava formiranje membrane fagozoma oko mitohondrije. Nastali mitofagozom se sjedinjuje sa lizozomom. Na kraju procesa niska pH vrednost unutar lizozoma, kao i hidrolitički enzimi razlože mitohondriju. Mitofagija povećava rezerve mitohondrija i povezana je sa stvaranjem novih organela, što dalje vodi ka poboljšanju mitohondrijalnog respiratornog kapaciteta [13].

Istraživanja su pokazala da URO A ima i sposobnost da stimuliše Nrf2-ARE signalni put tj. aktivira Nrf2 (*engl.* nuclear factor erythroid 2-related factor 2), ključni regulator antioksidativnog odgovora. Kada se Nrf2 aktivira, vezuje se za ARE (*engl.* antioxidant response element) u promotorskim regijama gena koji kodiraju glutation S-transferaze (GST). Ovaj signalni put dovodi do povećane ekspresije GST, enzima koji učestvuju u antioksidativnoj odbrani. GST enzimi igraju važnu ulogu u očuvanju nivoa glutationa, glavnog antioksidansa u ćelijama. Pojačana ekspresija GST, indukovana URO A, doprinosi neutralizaciji oksidativnih oštećenja [14].

URO A takođe poseduje sposobnost direktnog eliminisanja reaktivnih vrsta kiseonika (*engl.* reactive oxygen species, ROS), kao što su superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) i peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$). URO A deluje kao hvatač (*engl.* scavenger) slobodno-radikalskih vrsta kojima donira elektrone, čime ih stabilizuje i sprečava dalje oštećenje biomolekula (nukleinskih kiselina, proteina i lipida) [14].

2.4. Biološka uloga URO A

Uticaj URO A je primećen kod različitih zdravstvenih stanja. Istraživanja pružaju dokaze o antiinflamatornim, antiapoptotskim i antioksidativnim svojstvima, kao i kardioprotektivnim i neuroprotektivnim efektima urolitina A. Mnoge studije opisuju njegove korisne efekte kod starenja, mišićne disfunkcije, iritabilnosti creva, kardiovaskularnih bolesti i metaboličkih poremećaja. Najznačajnije biološke uloge su prikazane na **slici 3**.

Jedna od prvih publikacija koja je proučavala direktne efekte URO A *in vivo* bavila se njihovim efektom na proces starenja. Poređenje uticaja različitih metabolita na dugovečnost valjkastih crva vrste *Caenorhabditis elegans* pokazalo je da URO A produžava životni vek za 45%, dok njegov prekursor EA nema efekta. URO A sprečava opadanje mišićne mase tokom starenja, na šta ukazuje poboljšani integritet mišićnih vlakana i povećana pokretljivost kod starih crva tretiranih URO A. Pozitivni uticaj URO A na mišiće tokom starenja je pokazan i kod sisara. URO A je korišćen u ishrani sredovečnih miševa tokom 34 nedelje i oni su pokazali povećanu snagu skeletnih mišića i bolje aerobne performanse [15].

URO A pokazuje neuroprotektivne osobine kod životinjskih modela sa Alchajmerovom bolešću (*engl.* Alzheimer's disease, AD). Poboljšano učenje, zadržavanje pamćenja, preživljavanje neurona i neurogeneza u hipokampusu je postignuta primenom URO A kod miševa sa AD. Na ćelijskom nivou, URO A je snizila i nerastvorljive $A\beta_{1-42}$ plakove i nivoe fosforilisanog proteina tau, trenutno najrelevantnijih markera povezanih sa razvojem i progresijom AD [16]. Nedavno se pokazalo da URO A ima neuroprotektivne efekte kod mišjeg modela multiple skleroze (*engl.* multiple sclerosis, MS). Primena URO A u ranoj i kasnoj fazi smanjila je incidencu MS, kao i ozbiljnost bolesti, što se ogleda u smanjenju dendritskih ćelija, makrofaga i patogenih Th17 ćelija kao i smanjenom inflamacijom i demijelinizacijom bele materije [17].

Starenje je glavni faktor rizika kod progresivnog oštećenja intervertebralnih diskova kičme [18]. Pokazano je da URO A ublažava destrukciju diska kod pacova jer pospešuje proizvodnju proteoglikana i kolagena, ključnih molekula ekstracelularnog matriksa [19]. Druga studija pokazuje da je zaštita diskova od oštećenja povezana sa povećanom mitofagijom i smanjenom apoptozom u ćelijama diska [20].

Inflamatorna bolest creva (*engl.* inflammatory bowel disease, IBD) je uzrokovana disfunkcionalnim imunim sistemom, što dovodi do hronične upale digestivnog trakta i mikrobne

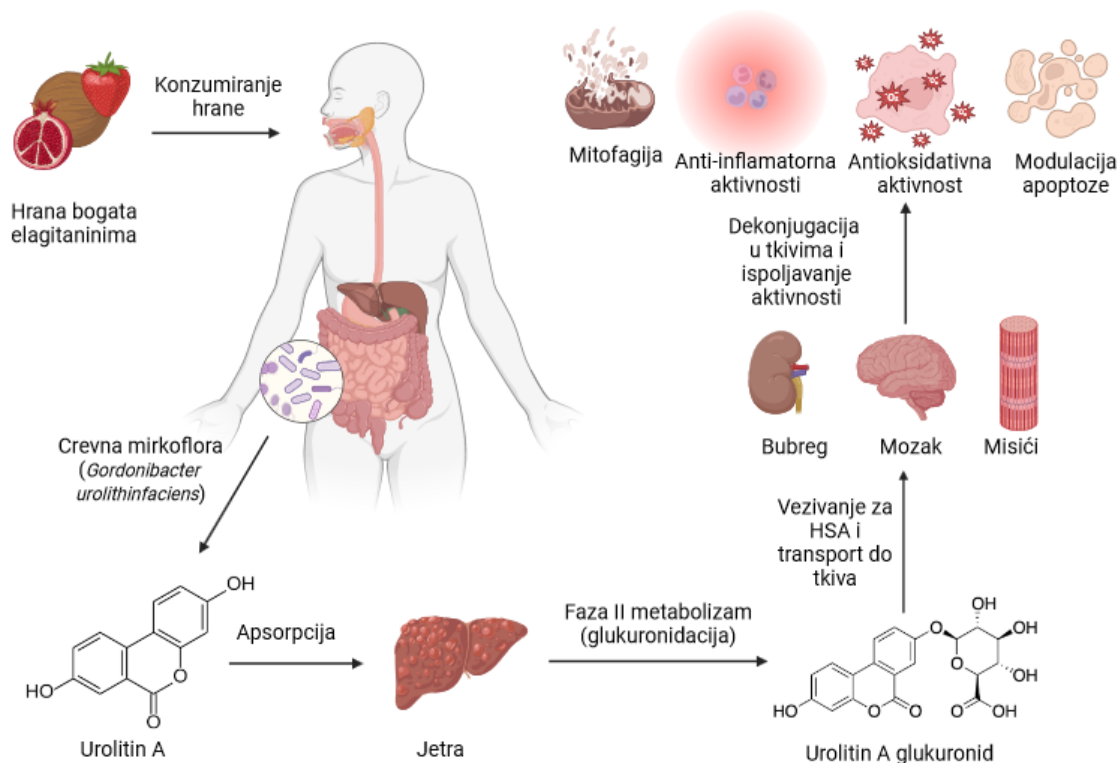
disbioze. URO A se primenjuje za lečenje IBD jer smanjuje nivoe markera zapaljenja creva i dovodi do boljeg integriteta sluzokože creva [21].

Antiinflamatorni efekat URO A je prvi put pokazan u studiji sa pacovima koji su imali kolitis koji je izazvan natrijum dekstran sulfatom (DSS). U debelom crevu ovih pacova utvrđeno je smanjenje nivoa mRNA i proteina ciklooksigenaze 2, koji predstavlja inflamatorni marker [14]. Dalja istraživanja su pokazala konzistentno smanjenje nivoa proinflamatornih citokina u plazmi: interleukina 1 beta (IL-1 β), interleukina 6 (IL-6) i faktora nekroze tumora alfa (TNF α) i u akutnom i u hroničnom kolitisu kod miševa [13].

URO A testiran je na miševima i pacovima sa akutnom povredom bubrega indukovanom cisplatinom. Nefrotoksičnost izazvana cisplatinom karakteriše se bubrežnom disfunkcijom zasnovanom na porastu nivoa kreatinina u plazmi zbog smanjenja brzine glomerularne filtracije. Oralna ili intraperitonealna primena URO A smanjuje tubularno oštećenje izazvano cisplatinom, što pokazuje histopatologija i smanjenje nivoa kreatinina u plazmi. Kada se primenjuje u vidu nanočestica kako bi mu se povećala biodostupnost, URO A poboljšava preživljavanje miševa koji su primili smrtonosnu dozu cisplatine [22-24].

URO A ima efekat na insulin-zavisna tkiva kao što su jetra, skeletni mišići i adipozno tkivo. Kada ova tkiva postanu rezistentna na insulin, stvara se metabolički sindrom (*engl.* metabolic syndrome, MetS) praćen metaboličkom disfunkcijom koja se ogleda u dislipidemiji, gojaznosti i glukoznoj netoleranciji. Suplementacija sa URO A pozitivno utiče na ove metaboličke poremećaje. Dnevna intraperitonealna primena URO A kod gojaznih miševa je smanjila akumulaciju triglicerida u jetri, ukupni holesterol i nivoe adiponektina u plazmi. Poboljšana je sistemska osetljivost na insulin. Međutim, nisu primećeni efekti na smanjenju telesne težine tretiranih miševa [25, 26].

Oralna primena URO A je proučavana i na pretkliničkom i kliničkom nivou. Ulažu se naponi da urolitini postanu biodostupniji i da se koriste u vidu suplemenata. URO A je nedavno priznat kao generalno bezbedan (*engl.* generally recognized as safe, GRAS) za upotrebu u vidu suplementa od strane FDA [27, 28]. Prvi klinički testiran suplement URO A jeste Mitopure. Mitopure je čist oblik urolitina A. URO A je jedini poznati molekul koji aktivira mitofagiju - proces u kom se selektivno recikliraju stare mitohondrije [29]. Nove studije kontinuirano istražuju i dokazuju potencijal ovog molekula.



Slika 3. Metabolizam elaginske kiseline do urolitina A i njegova biološka uloga

2.5. Serumski albumini kao nosači urolitina

Vezivanje je prvi korak u biološkim kaskadama inicirano različitim egzogenim i/ili endogenim supstancama. Mali molekuli, bilo prirodni ili sintetički, su važni agonisti i/ili antagonisti specifičnih ciljnih proteina i nukleinskih kiselina. Zato je neophodno proučiti interakcije različitih liganada sa biomakromolekulima kao što su proteini. Odavno je poznato da polifenoli interaguju sa proteinima i da su te interakcije strukturno zavisne. Ključni protein uključen u transport malih molekula u cirkulaciji je serumski albumin (SA). Generalno, apsorpcija, distribucija i metabolizam leka može biti pod uticajem prirode i jačine njihovih interakcija sa serumskim albuminom. Proučavanje mehanizma vezivanja različitih liganada za serumske albumine je presudno za razumevanje farmakodinamike i farmakokinetike lekova [30].

Pored transporta liganda, serumski albumini imaju ulogu u regulaciji osmotskog pritiska. To se objašnjava visokom koncentracijom, a niskom molekulskom težinom albumina, što rezultira visokom osmotskom aktivnošću po gramu. Osim toga, osmotska aktivnost albumina se povećava njegovim negativnim nabojem, koji drži osmotski aktivne katjone natrijuma. Humani serumski albumin (HSA) i goveđi serumski albumin (BSA) se obično koriste kao reprezentativni modeli proteina u biohemiji i kliničkoj medicini. Zato ovi serumski albumini spadaju u najbolje izučene proteine [31].

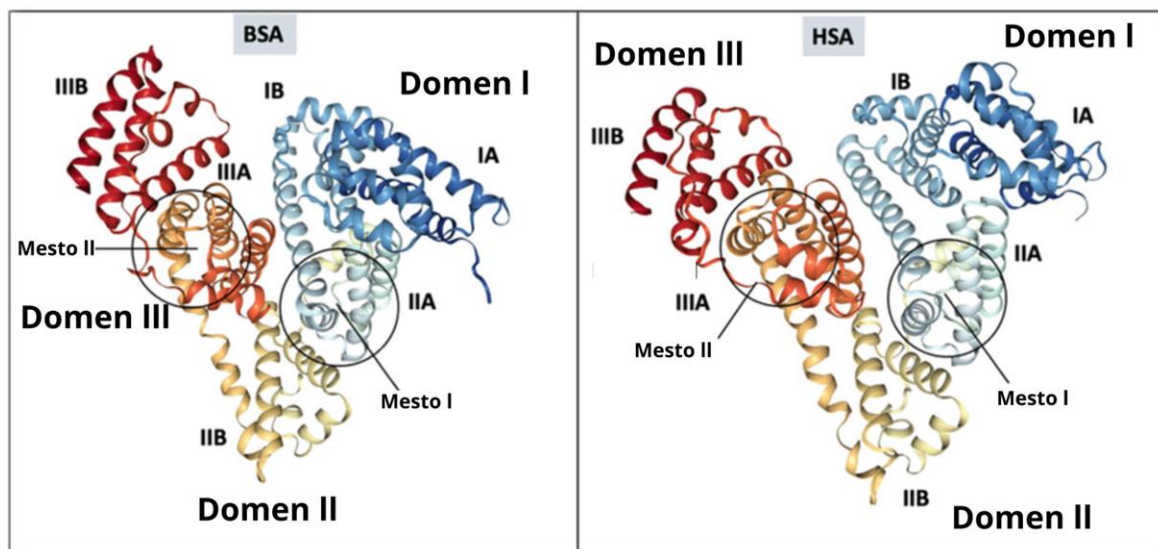
Serumski albumini se sintetišu u hepatocitima jetre kao preproalbumini. U endoplazmatskom retikulumu dolazi do cepanja N-terminalnog prepropeptida sa proteina pomoću serinske proteaze. Nakon toga, protein se transportuje do Goldzijeveg aparata pre nego što se na kraju izluči iz hepatocita

u cirkulaciju. Serumski albumini su najzastupljeniji proteini plazme u koncentraciji od 30-50 g/L, što odgovara 50% od ukupnih serumskih proteina. Uprkos velikoj koncentraciji albumina u plazmi, većina albumina nije u cirkulaciji, već je 60% skladišteno u ćelijskom međuprostoru. Iako je poluživot albumina oko 17 dana, albumin traje samo 16-18 h u cirkulaciji [32]. Xiao He i Daniel Carter su 1992. godine rešili trodimenzionalnu atomsku strukturu albumina pomoću rendgenske kristalografije od 2,8 Å [33].

Serumski albumini su jednolančani polipeptidi bez prostetičnih grupa. Sastoje se od samo jedne subjedinice (monomerni proteini) molekulske mase od oko 66 kDa. Primarna struktura HSA i BSA sadrži 585 i 583 aminokiselinskih ostataka, respektivno. Oba proteina se sastoje od tri domena (I, II i III) koja su strukturno slična i raspoređena u obliku jednakostraničnog trougla. Svaki domen je podeljen na dva subdomena (A i B) vezanih disulfidnim vezama (**slika 4**). Terminalni regioni sekvencijalnih domena doprinose formiranju interdomenskih spirala koje povezuju domen IB sa IIA, i IIB do IIIA, respektivno. Ova dva proteina, HSA i BSA, imaju visoku homologiju sekvence i strukturnu sličnost koja iznosi oko 80% [34, 35].

U primarnoj strukturi oba proteina nalazi se 35 ostataka cisteina. Njih 34 formira 17 disulfidnih mostova ostavljajući Cys-34 ostatak slobodnim i dostupnim za reakciju sa drugim molekulima. Razlika u primarnoj strukturi ova dva proteina je u broju Trp ostataka koji su odgovorni za unutrašnju florescenciju. Trp ostatak u HSA je na poziciji 214 aminokiselinske sekvence, lokalizovan u subdomenu IIA. Jedan Trp ostatak se nalazi na površini molekula BSA na poziciji 134 u subdomenu IB, dok se drugi nalazi na poziciji 212 u subdomenu IIA umotan u hidrofobno okruženje unutar proteinskog džepa. Sekundarna struktura se sastoji od 55% α -heliksa i 45% β -pločica. Ova razlika između dva albumina može se koristiti kao parametar za spektrofotometrijsko proučavanje karakteristika vezivnih mesta. U tercijarnoj strukturi oba proteina poseduju tri domena (I, II i III) koja su strukturno slična i raspoređena u obliku jednakostraničnog trougla. Svaki domen je podeljen na šest antiparalelnih spirala i dva subdomena (A i B) vezanih disulfidnim vezama [32].

Studije su pokazale da vezivanje liganada za različite subdomene varira. Strukturna organizacija albumina obezbeđuje nekoliko vezivnih mesta za ligande. Sudlow i saradnici su sugerisali da bi vezivanje liganada za HSA bilo ograničeno na subdomene II i III [36]. Na primer, dva hidrofobna džepa deluju kao mesta vezivanja za aromatične i heterociklične ligande u poddomenima IIA i IIIA, koji se nazivaju Sudlow mesto I (mesto vezivanja za varfarin) i Sudlow mesto II (mesto indola/benzodiazepina), respektivno. Primarna mesta vezivanja za dugolančane masne kiseline su u IB i IIIB domenima. Za sada je otkriveno ukupno šest dominantnih oblasti albumina za povezivanje sa ligandima [30, 35].



Slika 4. Strukture BSA i HSA sa domenima i mestima vezivanja liganada [37]

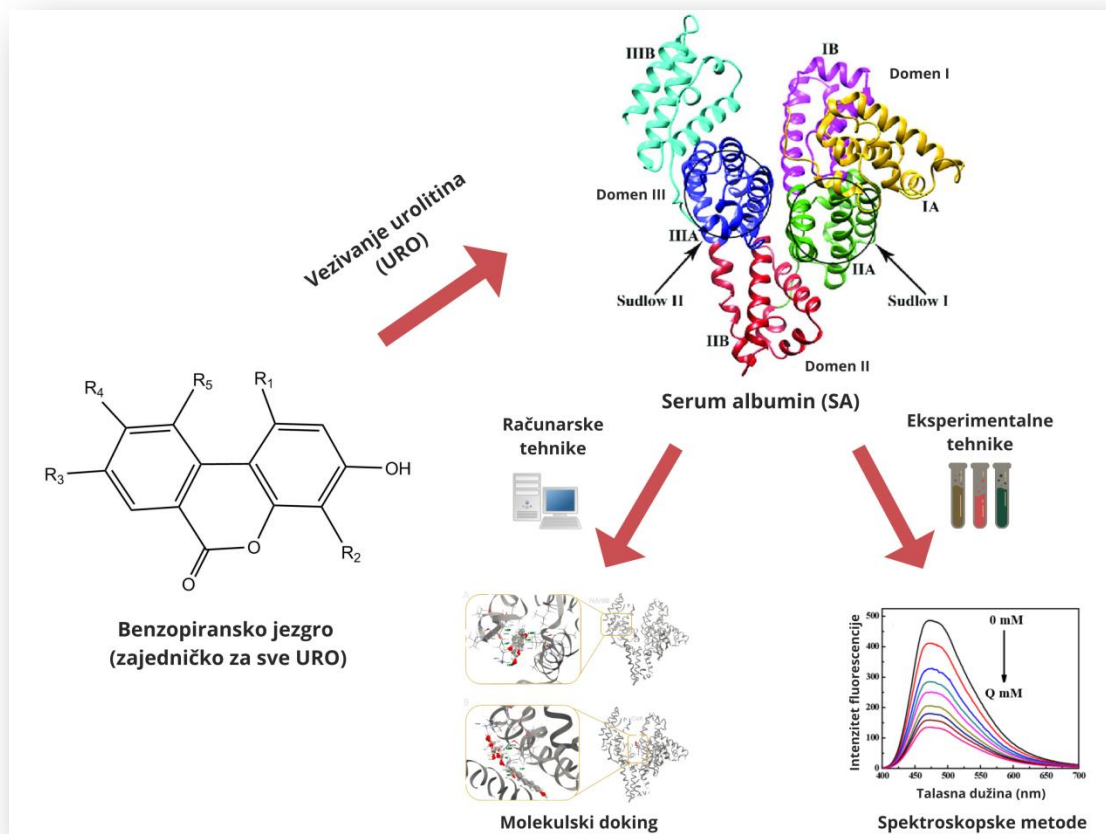
Interakcija leka sa serumskim albuminom generalno poboljšava distribuciju i biodostupnost leka u zavisnosti od specifičnih farmakokinetičkih svojstava leka. Pored toga, zbog svog obilja, albumin u serumu igra značajnu ulogu u farmakokinetičkom ponašanju različitih lekova, uključujući:

- poluživot leka u krvotoku,
- regulisanje efikasnosti leka,
- smanjenje toksičnosti leka i
- poboljšanje specifičnosti ciljanja leka [33].

2.6. Metode za proučavanje protein-ligand interakcija

Dobro je poznato da se fenolna jedinjenja, poput galne i elaginske kiseline, vezuju za serum albumine i putem cirkulacije transportuju do ciljnih tkiva u kojima ispoljavaju svoje uloge. Proces njihovog vezivanja može da se prati spektroskopskim metodama. Ove metode su odgovarajuće za ispitivanje interakcije između liganda i proteina zbog izuzetne osetljivosti, selektivnosti i reproduktivnosti u odnosu na konvencionalne pristupe (afinitetnu ili ekskluzionu hromatografiju, dijalizu, ultrafiltraciju i ultracentrifugiranje). Konvencionalne metode su niske osetljivosti, dugog vremena rada ili oboje [38].

Spektroskopske metode koje se najčešće koriste za karakterizaciju interakcija između serumskih albumina i urolitina su UV/VIS spektrofotometrija, fluorescentna spektroskopija, sinhrona fluorescentna spektroskopija, infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) i cirkularni dihiroizam (CD) spektroskopija. Rezultati dobijeni eksperimentalnim metodama se upotpunjuju studijama koje su izvedene računarskim (*in silico*) metodama. Jedna od takvih računarskih metoda jeste molekularni doking koji se koristi za ispitivanje protein-ligand interakcija (slika 5).



Slika 5. Proučavanje interakcija URO sa SA spektroskopskim i računarskim metodama

2.6.1. UV/VIS spektroskopija

Jednostavna i brza tehnika koja se koristi za detekciju protein-ligand interakcija jeste UV/VIS spektrofotometrija. U ovom regionu apsorbuju i proteini i ligandi. Apsorpcija proteina potiče od peptidne veze na 220 nm, ali i aromatičnih aminokiselinskih ostataka (Phe, Tyr i Trp) između 250 i 300 nm. Pored UV regiona, proteini mogu apsorbovati i u VIS regionu ako za sebe imaju vezane koenzime i prostetične grupe koje se ponašaju kao hromofore. Međutim, pored praćenja apsorpcije proteina može se pratiti apsorpcija liganada.

Urolitini su jedinjenja koja imaju karakteristične UV spektre. UV spektri urolitina u metanolu pokazuju dve glavne apsorpcione trake u oblasti od 240–400 nm. Ove trake su označene kao traka I (300–380 nm) i traka II (240–280 nm). U mnogima slučajevima dodatna traka III (između 280 i 300 nm) je takođe prisutna. Što se tiče URO A, karakteristični pikovi se javljaju na 246 i 280 nm u okviru trake 2, na 305 nm u okviru trake III i na 356 nm u okviru trake I. Konjugacija sa glukuronskom kiselinom ili sulfatom takođe ima merljive efekte na UV spektar i može se koristiti za identifikaciju metabolita urolitina [39].

2.6.2. Fluorescentna spektroskopija

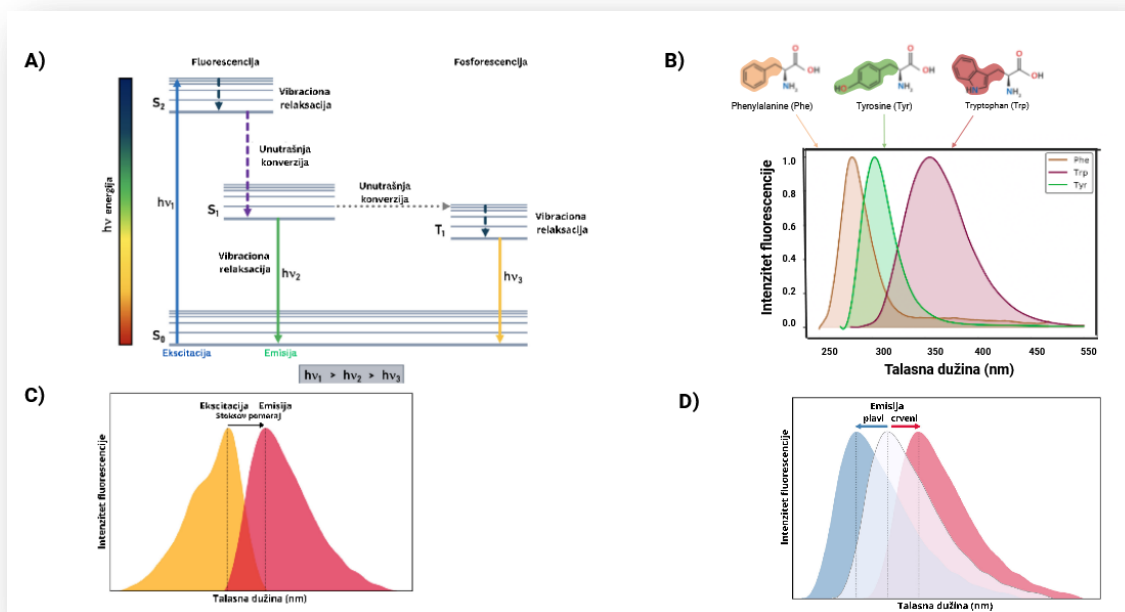
a) Principi metode

Fluorescentna spektroskopija je moćna tehnika koja se primenjuje za proučavanje vezivanja liganda za serumske albumine. Ovom metodom se prati promena fluorescencije nakon interakcije protein-ligand i mogu se dobiti informacije o vezivnom mestu liganda, afinitetu liganda ka proteinu, kao i o mehanizmu interakcije [40, 41]. Fenomen fluorescencije je baziran na prelazima elektrona ekscitovanih pomoću svetlosti u molekulima sa konjugovanim dvostrukim vezama. Elektroni prelaze na više energetske nivoe (S_2), a prilikom vraćanja na osnovni nivo (S_0) može doći do emisije svetlosti odnosno fluorescencije. Prelazi elektrona u procesu fluorescencije su šematski prikazani Jablonski dijagramom (**slika 6A**) [41]. Proteini često sadrže prirodne fluorescentne molekule kao što su aromatične aminokiseline (triptofan, tirozin i fenilalanin). Unutrašnja fluorescencija proteina potiče od ekscitacije ovih aminokiselinskih ostataka na talasnoj dužini (λ_{ex}) od 280 nm (**slika 6B**). Maksimum emisije fluorescencije proteina je uvek na daljim talasnim dužinama od maksimuma ekscitacije ($\lambda_{em} > \lambda_{ex}$). Ovaj fenomen nastaje usled vibracione relaksacije u pobuđenom singletnom stanju i naziva se Stoksov pomeraj (**slika 6C**) [41].

Vezivanje liganda može da promeni mikrookruženje aromatičnih aminokiselinskih ostataka, izazivajući i promene u intenzitetu emisije fluorescencije. Intenzitet fluorescencije može da se poveća ili smanji. Proces smanjenja fluorescencije je poznat kao gašenje fluorescencije (*engl.* quenching). Takođe, uočavaju se i promene u emisionim maksimumima spektara. Pomak emisionog maksimuma može biti ka kraćim (plavi pomeraj) ili dužim talasnim dužinama (crveni pomeraj) (**slika 6D**). Plavi pomeraj se dešava kada je fluorofora izložena hidrofobnom mikro-okruženju nakon interakcije sa ligandom i tada biva angažovana u jačim interakcijama u poređenju sa prethodnom strukturom proteina. Crveni pomeraj implicira da se aminokiselinski ostaci nalaze u polarnoj sredini i više su izloženi rastvaraču [41].

b) Mehanizmi gašenja fluorescencije

Optimalna koncentracija proteina rastvorenog u puferu za fluorescentnu spektroskopiju se pronalazi snimanjem fluorescentnih spektara. Potom se u rastvor proteina fiksne koncentracije postepeno dodaje ligand u različitim koncentracijama. Merenja se ponavljaju za svaku koncentraciju liganda kako bi se uočile promene u fluorescentnoj emisiji. Iz ovih promena može se napraviti titraciona kriva koja se koristi za izračunavanje konstante vezivanja (K_d) koja opisuje afinitet proteina za ligand. Najčešće sa povećanjem koncentracije liganda dolazi do gašenja fluorescencije i to kroz statičke ili dinamičke mehanizme interakcije. Statičko gašenje se javlja kao rezultat formiranja stabilnog kompleksa između fluorescentnog molekula (fluorofore) i kvenčera fluorescencije (*engl.* quencher). Nastali kompleks nije fluorescentan što dovodi do smanjenja izmerenog intenziteta fluorescencije. Dinamičko gašenje se naziva kolizionim gašenjem jer se fluorofora gasi sudarom sa kvenčerom bez formiranja kompleksa. Energija koja bi inače bila emitovana kao fluorescentna svetlost se prenosi na kvenčer kroz sudar, a zatim se raspršuje kao toplota. Dinamičko gašenje je zavisno od difuzije, što znači da efikasnost gašenja zavisi od temperature i viskoznosti okoline [38].



Slika 6. A) Jablonski dijagram B) Spektri aromatičnih aminokiselina C) Stoksov pomeraj D) Crveni i plavi pomeraj [41]

c) Stern-Volmerova konstanta gašenja fluorescencije

Za kvantitativnu analizu gašenja fluorescencije koristi se Stern-Volmerova jednačina koja opisuje odnos između koncentracije kvenčera i smanjenja intenziteta fluorescencije. Veličina Stern-Volmerove konstante ili konstante gašenja, K_{SV} , kao i spektri apsorpcije, mogu se koristiti za razlikovanje između statičkog i dinamičkog gašenja. Kod dinamičkog mehanizma gašenja fluorescencije nema promene u spektrima apsorpcije fluorofora, jer se ono dešava samo u pobuđenom stanju fluorofore. Apsorpcioni maksimum fluorofora ostaje nepromenjen i ukazuje na to da kvenčer ne formira stabilan kompleks sa fluoroforom. Apsorpcioni spektri kompleksa fluorofora-kvenčer mogu imati različit apsorpcioni maksimum u poređenju sa slobodnom fluoroforom. Pojava novih pikova, pomeranje apsorpcionog maksimuma (crveni ili plavi pomeraj) ili smanjenje intenziteta osnovnog spektra ukazuje na formiranje kompleksa [40].

Visoka vrednost K_{SV} ukazuje na efikasno gašenje što može značiti jaku interakciju između proteina i liganda. K_{SV} se obično smanjuje sa povećanjem temperature jer više temperature slabe interakciju dva molekula i samim tim smanjuju stabilnost kompleksa. Tamo gde je statičko gašenje dominantno konstanta vezivanja ili asocijacije između fluorofore i kvenčera može se dobiti korišćenjem Stern-Volmerove teorije [42].

d) Izračunavanje termodinamičkih parametara protein-ligand interakcija

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka o vezivanju liganda i proteina (tj. promene u intenzitetu fluorescencije sa promenom koncentracije liganda na više različitih temperatura), možemo izračunati termodinamičke parametre interakcije poput: promene slobodne Gibsove energije (ΔG), promene entalpije (ΔH) i promene entropije (ΔS).

Iz Stern-Volmerove analize možemo dobiti konstantu vezivanja (*engl.* binding constant, K_b) koja je povezana sa afinitetom liganda za protein. Ako je poznata vrednost ove konstante, možemo izračunati Gibsovu slobodnu energiju vezivanja. Idealno je da se izmeri K_b na tri do četiri različite temperature, kako bi se izračunali ostali termodinamički parametri. Preporučuje se da merenja budu sprovedena u temperaturnom opsegu od 10 do 15 K između najniže i najviše merene temperature, na primer: 293 K, 298 K, 303 K, 308 K. Više temperature mogu ubrzati difuziju. Međutim, treba voditi računa da previše visoka temperatura ne dovede do denaturacije proteina, što bi narušilo tačnost merenja. Preniske temperature mogu usporiti molekularne interakcije i mogu dovesti do sporije kinetike, pa ih je potrebno izbegavati.

Ako se merenja vrše na tri ili više različitih temperatura, može se koristiti Van't Hoffova jednačina za izračunavanje promene entalpije ΔH i promene entropije ΔS . Ove dve vrednosti se računaju na osnovu grafika zavisnosti $\ln K_b$ od $1/T$. Iz linearne regresije se određuju ΔH (nagib linije) i ΔS (preseka sa y-osom). Ukoliko se dobije negativna vrednost ΔG , onda je proces vezivanja liganda za protein spontan. Dobijene vrednosti za ΔH i ΔS ukazuju na prirodu interakcija između proteina i liganda. Pozitivna vrednost ΔH ukazuje na endotermne interakcije (većina interakcija vođenih hidrofobnim efektom), dok negativna vrednost ΔH ukazuje na egzotermne interakcije (poput formiranja vodoničnih veza ili van der Waalsovih interakcija). Vrednost ΔS može biti pozitivna ili negativna u zavisnosti od toga da li je proces vezivanja entropijski ili entalpijski vođen [43].

2.6.3. Sinhrona fluorescentna spektroskopija

Sinhrona fluorescentna spektroskopija (*engl.* synchronous fluorescence spectroscopy, SFS) je metoda za istraživanje konformacionih promena u proteinima usled prisustva kvenčera. U sinhronoj fluorescenciji, ekscitacija i emisija se detektuju istovremeno sa unapred određenom razlikom talasne dužine ($\Delta\lambda$) između njih. U zavisnosti od izabranog $\Delta\lambda$, rezultujući signal bi mogao da proizvede usku traku sa maksimumom talasne dužine koja je karakteristična za dato jedinjenje. Ova metoda pomaže u pružanju informacija o lokalnom okruženju proteina oko aromatičnih aminokiselinskih ostataka nakon interakcije sa ligandima. Razlika u fluorescenciji između talasnih dužina ekscitacije i emisije odražava prirodu spektra. Razlika talasne dužine ($\Delta\lambda$) od 15 nm je karakteristična za tirozinski ostatak, dok je 60 nm za triptofanske ostatke. Prema tome, svaka promena u maksimumu talasne dužine emisije odražava promene mikro-okruženja oko aromatičnih aminokiselinskih ostataka [44].

Glavna prednosti SFS jeste spektralno pojednostavljenje. U konvencionalnoj fluorescenciji spektri se sastoje od nekoliko traka kao rezultat fiksnog izvora ekscitacije. Prisustvo takvog viška traka u ukupnom spektru može se smanjiti sinhronom spektroskopijom. Pošto je dobijeni spektar proizvod množenja dve istovremeno rastuće i/ili opadajuće funkcije, jače trake se povećavaju selektivno, a slabije se značajno smanjuju [45].

2.6.4. CD spektroskopija

Sekundarne strukture proteina predstavljaju uvijanje polipeptidnog niza u lokalno uređene strukture, gde se priroda bočnih ostataka ne uzima u obzir. Međutim, baš od prirode tih bočnih aminokiselinskih ostataka zavisiće koja će sekundarna struktura nastati u polipeptidnoj kičmi. Najzastupljenije sekundarne strukture proteina su α -heliksi, β -pločice i β -zavoji. Ove strukture su asimetrične (hiralne) tj. ne mogu se preklapati sa svojim likom u ogledalu. Ovi hiralni molekuli na određenoj talasnoj dužini različito apsorbuju levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost. Ta njihova osobina je poznata kao cirkularni dihroizam (*engl.* circular dichroism, CD) i posledica je njihove

strukturne asimetrije. Metoda koje se koristi za ispitivanje hirlnih molekula jeste CD spektroskopija, koja spada u apsorpcione spektroskopske metode [46].

Proteini poseduju veliki broj hromofora (peptidnu vezu, disulfidne mostove i aromaticne aminokiselinske ostatke) koji mogu da daju CD signale. Upravo je cirkularni dihiroizam peptidnih veza značajan u proceni udela sekundarnih struktura proteina u rastvoru. Sekundarne strukture proteina proizvode specifične pikove jedinstvenih veličina i oblika u dalekom UV regionu (*engl.* far-UV). Daleka UV-oblast obuhvata snimanje u oblasti 180-250 nm, dok se bliskim UV oblastima (*engl.* near-UV) smatraju iznad 250 nm. U dalekom-UV CD spektru HSA, pojava dve negativne apsorpcione trake (minimuma) na 208 nm (p-p*) i 222 nm (n-p*), karakteristične su za prisustvo α -heliksne strukture u HSA. Vezivanje liganda za protein dovješće do promena u sekundarnim strukturama, što dalje vodi do promena u CD spektrima [47].

Kako bi se procenile sekundarne strukture u proteinima koriste se vrlo jednostavne jednačine, kao i brojni složeniji algoritmi. Široko korišćeni algoritmi uključuju SELCON (samodosledan), VARSLC (izbor promenljive), CDSSTR, K2d i CONTIN [48].

2.6.5. FT-IR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (*engl.* Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) bavi se vibracijama molekula. Svaka funkcionalna grupa ima svoju diskretnu vibracionu energiju koja se može koristiti za identifikaciju molekula. Uzorak se izlaže infracrvenom svetlu, pri čemu molekuli u uzorku apsorbuju energiju u specifičnim frekvencijama, što izaziva vibracije hemijskih veza. FTIR detektor meri apsorpciju svetlosti pri različitim frekvencijama. Fourierova transformacija zatim omogućava pretvaranje signala iz vremenskog domena u frekvencijski domen, što daje odgovarajući spektar. Spektar se prikazuje u talasnim brojevima (cm^{-1}), a pikovi odgovaraju određenim vibracijama funkcionalnih grupa u molekulu.

FTIR je još jedna tehnika za proučavanje sekundarnih struktura proteina. Nekoliko traka karakteriše IR spektar proteina: amidna traka I (region između 1660 i 1700 cm^{-1}), amidna traka II (region između 1550 i 1500 cm^{-1}) i amidna traka III (region između 1250 i 1350 cm^{-1}). Amidna traka I proizilazi iz valencionih C=O vibracija, amidna traka II nastaje sprežanjem valencionih C-N vibracija sa deformacionim N-H vibracijama u ravni, dok amidna traka III potiče od valencione C-N vibracije koja se kupluje sa deformacionim N-H vibracijama. Ograničenje ove metode je njena osetljivost na jaku apsorpciju molekula H₂O u regionu amida I, što zahteva korekciju signala za doprinos pufera. Sprovođenje eksperimenata u D₂O bi omogućile analizu podataka mnogo lakšim pošto D₂O ne apsorbuje u ovom spektralnom regionu. Ako vezivanje liganda izaziva diskretne promene u sekundarnoj strukturi proteina, korišćenje i FT-IR i daleke UV CD spektroskopije bi dale najbolji izbor metoda za ispitivanje tih promena [49, 50].

2.6.6. Molekulski doking

Razumevanje principa po kojima se ligandi (mali molekuli) prepoznaju i stupaju u interakciju sa makromolekulima (proteinima) je od velikog značaja za razvoj lekova. Eksperimentalne tehnike mogu da daju određene informacije o protein-ligand interakcijama, ali često znaju da budu naporne, dugotrajne i skupe za određivanje afiniteta vezivanja. Računarski (*in silico*) pristupi imaju ogroman potencijal u pružanju informacija kao što su predviđanje afiniteta i načina vezivanja liganda za protein [51].

Računarska metoda koja se koristi za predviđanje strukture protein-ligand kompleksa je molekulski doking. Ova metoda koristi poznate trodimenzionalne (3D) strukture proteina i liganda kako bi sa značajnim stepenom tačnosti predvidela konformaciju liganda unutar aktivnog mesta proteina. 3D strukture ovih makromolekula mogu se lako preuzeti iz Proteinske baze podataka (*engl.* Protein Data Bank, PDB), koja omogućava pristup 3D atomskim koordinatama dobijenim eksperimentalnim metodama. Ukoliko 3D strukture nisu dostupne u bazi podataka, pristupa se modelovanju [52].

Dva aspekta su ključna za protein-ligand doking: algoritmi pretraživanja i funkcije bodovanja. Konformacija i orijentacija se jednim imenom označavaju kao „poza“ (*engl.* biniding pose) liganda u vezivnom mestu proteina. Različiti algoritmi pretražuju ove poze uzimajući u obzir roto-translacione i unutrašnje stepene slobode liganda, dok je procena afiniteta vezivanja liganda za protein označena kao funkcija bodovanja (*engl.* scoring function) [52, 53].

Na efikasnost doking procesa utiče veličina liganda, posebno ako sadrži veliki broj rotirajućih veza. Svaka nova rotirajuća veza inherentno povećava stepene slobode liganda, čime se povećava broj mogućih konformacija. Poboljšani konformacioni prostor je stoga mnogo složeniji za istraživanje, što daje manje tačne rezultate [52]. Takođe, pored proteina i liganda u sistemima imamo i molekule rastvarača. Sve ovo dodatno povećava stepene slobode i komplikuje proces dokinga. Iz tih razloga, molekuli rastvarača se mogu zanemariti. Kako bi se dodatno uprostio proces dokinga, vrše se aproksimacije. Ide se sa pretpostavkom da je protein rigidna struktura. Međutim, idealno bi bilo da su i protein i ligand fleksibilni [54].

Protein-ligand doking je zbog svojih prednosti počeo ubrazno da se razvija i poslednjih decenija je postao atraktivna oblast istraživanja sa velikim izborom dostupnih softverskih paketa. Najkorišćeniji i dobro uspostavljeni paketi su: AutoDock, AutoDock Vina, GOLD, DOCK, FlexX i Glide. Ovi paketi implementiraju različite algoritme za rešavanje problema dokinga. AutoDock Vina je jedan od najboljih izbora zbog svoje visoke pouzdanosti. AutoDock Vina je „open-source“ program, besplatan za akademsku upotrebu, koji koristi 3D strukture proteina i liganda za predviđanje molekulskih interakcija. U prvoj fazi AutoDock Vina pretražuje konformacioni prostor za moguće načine protein-ligand interakcija. Nakon toga, u drugoj fazi, program koristi funkciju bodovanja da bi se odredio najpogodniji položaj u pogledu energija interakcije [55].

2.7. Sistemi za dostavu bioaktivnih jedinjenja

Efikasnost egzogeno primenjenog bioaktivnog jedinjenja zavisi od stepena njegove dostupnosti na ciljnom mestu delovanja. Dostupnost zavisi od same njegove prirode, odnosno od rastvorljivosti, pKa vrednosti ili molekulske težine. Ove karakteristike u velikoj meri utiču na sposobnost molekula da uđe u ciljnu ćeliju i ispolji svoju biološku aktivnost. S druge strane, spoljašnji faktori kao što je pH vrednost u okolini čine lek sklonim inaktivaciji ili degradaciji. Takođe, molekuli koji se sreću u organizmu tokom procesa distribucije mogu da interaguju sa bioaktivnim jedinjenjem, što rezultira sinergističkim ili antagonističkim interakcijama koje moduliраju dejstvo datog bioaktivnog jedinjenja, pa čak mogu dovesti do njegove inaktivacije. Posle administracije biološki aktivnog jedinjenja, procesi apsorpcije, distribucije i metabolizma mogu dovesti do njegovih fizičko-hemijskih modifikacija. Izazov distribucije biološki aktivnog jedinjenja je da se izvrši njegovo oslobađanje u pravo vreme na ciljno mesto na bezbedan i ponovljiv način [56].

Sistemi za isporuku lekova nano-razmera (*engl.* nanoscale drug delivery systems, DDS) su prethodnih decenija postali predmet istraživanja. Oni su dizajnirani tako da transportuju aktivno jedinjenje kroz cirkulaciju kako bi ono na kontrolisan način oslobodilo svoj terapijski potencijal. Inkapsulacijom bioaktivnog jedinjenja unutar zaštitne strukture povećava se njegova bioraspoloživost, poboljšava terapijska efikasnost, smanjuje učestalost potrebnog doziranja, a takođe postiže i fizička zaštita. Ovi sistemi mogu biti od proteina, polisaharida, lipida, sintetičkih polimera ili od neorganskih soli. Izbor sistema nano-razmera zavisi od mnogih faktora kao što su: fizička svojstva bioaktivnih jedinjenja (rastvorljivost i stabilnost u vodi), naelektrisanje i permeabilnost sistema, stepen biorazgradljivosti, biokompatibilnosti i toksičnosti sistema, kao i mogućnost oslobađanja bioaktivnog jedinjenja [56].

U idealnom slučaju, nano sistemi za isporuku bioaktivnih jedinjenja treba da ispunjavaju određene tehničke i ekonomske zahteve. Prvo, priroda sistema ne bi trebalo da izazove bilo kakav neželjeni odgovor u organizmu primaoca. Ovi sistemi treba da budu biokompatibilni, kao i njihovi proizvodi razgradnje. Drugo, svojstva sistema moraju obezbediti produženu zaštitu bioaktivnim jedinjenjima, omogućavajući im hemijsku stabilnost tokom vremena. Treće, skalabilnost procesa proizvodnje treba da bude lako izvodljiva i ekonomski isplativa. **Tabela 2** sumira karakteristike idealnog sistema nano-razmera za transport bioaktivnih jedinjenja u biomedicinske svrhe [56].

Tabela 2. Karakteristike idealnog nanosistema za dostavu bioaktivnih jedinjenja [56]

Uslovi proizvodnje	Svojstva enkapsulacije	Profil otpuštanja
Blagi uslovi (odsustvo visokih T i P, agresivnih hemikalija)	Stabilnost	Kontrolisano
Skalabilnost	Nema ranog oslobađanja	Ciljano
Niska cena	Netoksičnost	Osetljivost na pH i T
Reproducibilnost	Prolazak bioloških barijera	
Mala varijabilnost od serije do serije	Biorazgradivost	

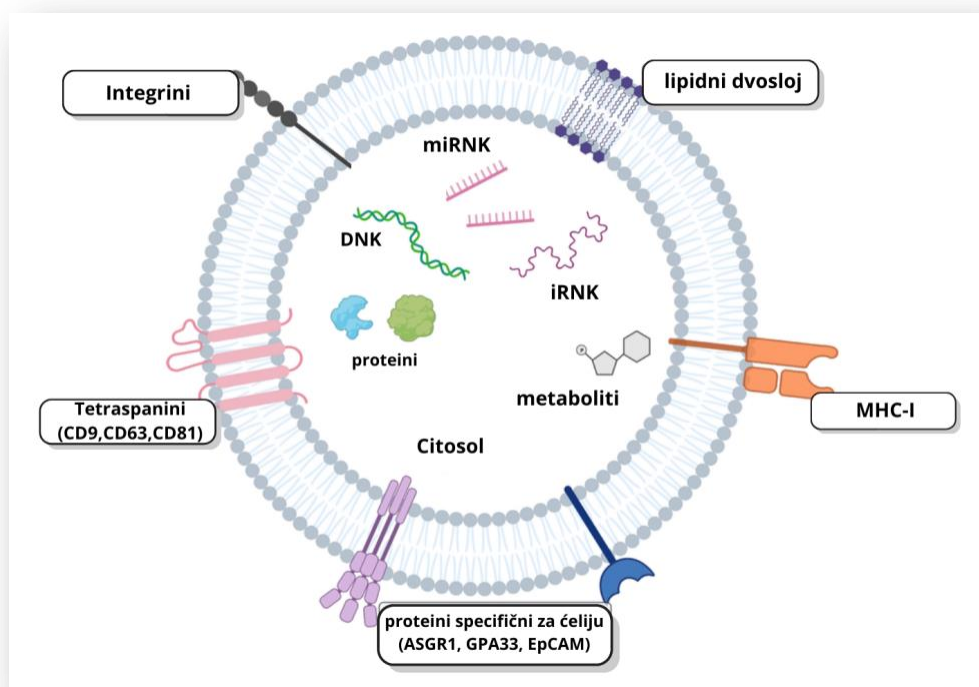
Pojavili su se različiti sintetički nanosistemi za dostavu bioaktivnih jedinjenja. Lipozomi, micele, dendrimeri, nanokapsule i nanočestice zasnovane na peptidima su među najistaknutijim primerima ovih sistema [57]. Među njima, najviše proučavani sistem za dostavu jeste lipozom. Doxil® jeste prva lipozomalna formulacija na tržištu odobrena od strane FDA još 1995. godine [58]. Lipozomi se sastoje od biokompatibilnog lipidnog dvosloja u koji može da se smesti hidrofobno bioaktivno jedinjenje i unutrašnje vodene faze u kojoj se hidrofilna jedinjenja rastvaraju. Na ovaj način je moguće dostaviti i hidrofobna i hidrofilna bioaktivna jedinjenja do ciljnih mesta. Uprkos ovim prednostima lipozomalnih formulacija, postoje i mnoge prepreke za isporuku datih jedinjenja ciljnim organima. Na primer, akumulacija lipozoma u jetri i slezini ograničava dozu bioaktivnog jedinjenja koja stiže na ciljno mesto. Takođe, akumulacija lipozoma u makrofagima u većim dozama može uticati na njihovu fagocitnu aktivnost, što dalje vodi do supresije imuniteta. Dodatni nedostatak upotrebe lipozomskih formulacija je aktivacija akutne alergijske reakcije koja izaziva oslobađanje histamina i leukotriena što dovodi do prekida terapije kod preosetljivih osoba [57, 59].

Klinička primena ovih nanosistema suočava se sa sledećim problemima: citotoksičnost materijala i brzo uklanjanje iz organizma, imunogenost, kao i neprolazak krvno-moždane barijere

(*engl.* blood-brain barrier, BBB). Jedan od načina da se prevaziđu ova ograničenja je prelazak na prirodne sisteme za isporuku bioaktivnih jedinjenja. Endogeni nanosistemi pokazali su obećavajuće rezultate u dostavljanju bioaktivnih jedinjenja i terapijsku efikasnost zbog njihove prirodne biokompatibilnosti *in vivo* [60]. Jedan od najistaknutijih primera prirodnih nanosistema za isporuku bioaktivnih jedinjenja su ekstracelularne vezikule (*engl.* extracellular vesicles, EV). EV su membranske strukture sposobne da transportuju različite biomolekule od ćelija donora do ćelija primaoca, čime se menja fiziologija ćelija primaoca. Na osnovu ovoga zaključeno je da mogu poslužiti kao prirodni nosači za bioaktivna jedinjenja i lekove.

2.7.1. Biološka uloga i terapijski potencijal ekstracelularnih vezikula

Ekstracelularne vezikule su složene membranske strukture sastavljene od lipidnog dvosloja koji sadrži transmembranske proteine i obuhvata rastvorljive hidrofilne komponente. Najčešće rastvorljive komponente prisutne u unutrašnjosti EV su aktivni biomolekuli, kao što su nukleinske kiseline, proteini i ugljeni hidrati (slika 7) [61].



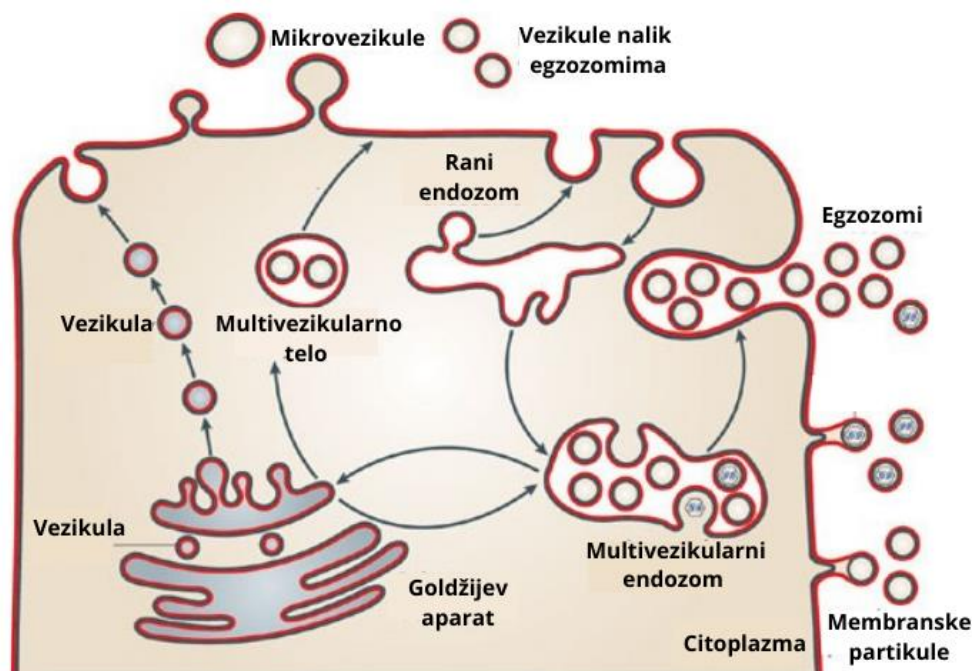
Slika 7. Struktura ekstracelularne vezikule [61]

Glavna uloga EV jeste transport ovih biomolekula od jedne ćelije do druge ćelije. Ćelije oslobađaju ove vezikule u ekstracelularni prostor kako bi obavile međućelijsku komunikaciju putem različitih mehanizama, kao što su direktna fuzija membrana, interakcija receptor-ligand, endocitoza i fagocitoza [62]. EV posreduju u fiziološkim i patološkim stanjima i bivaju oslobađene od strane normalnih, ali i tumorskih i apoptotskih ćelija. Mogu se pronaći u mnogim telesnim tečnostima, uključujući krv, salivu, urin, mleko, semenu i amnionsku tečnost. Pored humanih telesnih tečnosti, EV se nalaze u humanim ćelijskim kulturama, u ćelijama životinjskog porekla, kod biljaka, bakterija, gljiva i parazita [62].

Trenutna klasifikacija EV se zasniva na njihovoj veličini i biogenezi. Stoga se EV mogu podeliti u tri glavne kategorije (prikazane na **slici 8**) koje se međusobno razlikuju po veličini, poreklu i funkciji [63, 64]:

1. **Egzozomi** (30-150 nm) nastaju iz endozoma, kao intraluminalne vezikule unutar multivezikularnih tela (*engl.* Multi vesicular body, MVB). Nakon što se formiraju, ove vezikule se luče spajanjem MVB sa ćelijskom membranom i oslobađanjem u ekstracelularni prostor. Oni sadrže proteine, lipide, iRNA kao i nekodirajuće RNA (miRNK, lncRNK itd). Učestvuju u regulaciji fizioloških (imuni odgovor, koagulacija) i patoloških (signalizacija u tumorskim ćelijama koja pospešuje rast ćelija i angiogenezu) procesa u ćeliji.
2. **Mikrovezikule** su veće od egzozoma (100-1000 nm) i formiraju se direktno od ćelijske membrane procesom koji uključuje otpuštanje dela membrane u vidu vezikula. One mogu sadržati ćelijske proteine i nukleinske kiseline, i igraju ključnu ulogu u transportu bioaktivnih molekula do različitih ćelija i tkiva.
3. **Apoptotska tela** nastaju tokom ćelijske smrti i mogu sadržati ostatke ćelijskih komponenti. Ona su veća (1-5 μm) i specifična za ćelije koje prolaze kroz apoptozu, ali mogu imati važnu ulogu u imunološkim odgovorima, prenoseći antigene do fagocita i drugih imunskih ćelija [63].

Tokom poslednje decenije naučno interesovanje za EV se naglo povećalo, nakon što se pokazalo da bioaktivna jedinjenja upakovana u EV mogu da se prenesu između ćelija i izmene fenotip ćelija primaoca. Ćelije mogu da pakuju biomolekule u EV putem endogenih mehanizama sortiranja i oslobađaju ih konstitutivno ili nakon stimulacije. Njihova uloga u prenosu bioaktivnih molekula ih čini ključnim posrednicima u fiziološkim i patofiziološkim procesima. Otkriće da EV predstavljaju prirodni mehanizam za prenos informacija između ćelija, omogućilo im je da postanu sistemi za dostavu lekova i bioaktivnih molekula [52].



Slika 8. Različiti tipovi sekretovanih vezikula [63]

2.7.2. Uloga ekstracelularnih vezikula u dostavi bioaktivnih jedinjenja

Ekstracelularne vezikule su zbog svojih bioloških osobina prepoznate kao važni prirodni sistemi nano razmera za dostavu bioaktivnih jedinjenja. Prednosti korišćenja EV u dostavi bioaktivnih jedinjenja uključuju njihovu malu veličinu, blago negativan zeta potencijal koji sprečava aglomeraciju i/ili fuzionisanje u cirkulaciji, odsustvo citotoksičnosti, kao i njihovu sličnost sa ćelijskim membranama. Pored toga, neke EV pokazuju povećanu sposobnost da izbegnu degradaciju ili uklanjanje od strane imunog sistema [60].

Prinos EV i fizičko-hemijska svojstva EV koja utiču na njihovu farmakokinetiku mogu da variraju u zavisnosti od tipa donorske ćelije. Iz tih razloga neophodno je odabrati odgovarajući tip donorske ćelije kao izvora EV [65]. Istraživanje različitih ćelijskih izvora za terapijske EV je značajno, jer je sastav lipida i površinskih proteina EV jedan od ključnih faktora za njihovu funkciju. Pored toga, u zavisnosti od ćelijskog porekla, površinski markeri mogu imati funkcije koje umanjuju predviđeni efekat EV terapije. Površinski markeri mogu izazvati nespecifično vezivanje EV za ćelije koje nisu ciljane. Ove nespecifične interakcije mogu rezultirati smanjenom dostupnošću EV na željenom mestu delovanja što dovodi do gubitka terapijske efikasnosti. Neki markeri na površini EV mogu biti prepoznati kao strani od imunskog sistema, što može izazvati fagocitozu od strane makrofaga. Strategija za prevazilaženje ovog problema jeste modifikacija površinskih markera EV. Stoga je ključno da se pažljivo razmotre biološke karakteristike EV dobijenih iz različitih tipova ćelija i da se izvagaju prednosti i mane u terapijske svrhe [60, 66].

EV mogu efikasno zaštititi molekule od metaboličke transformacije i degradacije, čime se povećava njihova biodostupnost i stabilnost pri transportu kroz krvotok i digestivni trakt. Površinski molekuli na EV omogućavaju specifično vezivanje za određene ćelijske receptore, što znači da EV mogu biti programirane da ciljaju specifična tkiva. Zbog prirodnog porekla, EV ne izazivaju imunski odgovor, što ih čini pogodnijim nosačima u poređenju sa veštačkim sistemima poput lipozoma. EV iz endogenih izvora uspešno maskiraju prirodne komunikacione puteve između ćelija, čime se smanjuje imunogenost [67].

2.7.3. Metode izolovanja ekstracelularnih vezikula

Istraživačima je prilično izazovno da dobiju EV visoke čistoće nakon izolovanja što ograničava njihovu kliničku primenu. Iz tog razloga je razvijeno nekoliko novih tehnika i komercijalnih proizvoda za izolovanje EV. Metode su zasnovane na principima razdvajanja koja koriste fizička svojstva EV, kao što su njihova gustina, masa i oblik. Pored toga, razdvajanje se takođe može izvršiti na osnovu fizičko-hemijskih i biohemijskih svojstava EV, kao što su naelektrisanje, hidrodinamika, rastvorljivost i svojstva površine (odnosno proteina na površini). Svaka metoda izolovanja EV ima svoje prednosti i mane. Shodno tome, izolovanje se može izvršiti pomoću jedne ili kombinovanjem više metoda u zavisnosti od svojstava EV. Različite metode izolovanja su prikazane na **slici 9** i mogu se podeliti u sledeće kategorije:

- izolovanje na osnovu gustine,
- izolovanje na osnovu veličine,
- izolovanje na osnovu afiniteta,
- izolovanje na osnovu precipitacije i
- izolovanje zasnovano na mikrofluidici.

Za izolovanje EV na osnovu gustine koriste se diferencijalno centrifugiranje i centrifugiranje u gradijentu gustine. Ultracentrifugiranje (UC) je najčešća metoda i trenutni zlatni standard za izolovanje EV. Ukratko, UC je metoda centrifugiranja u kojoj se centrifugalna sila postepeno povećava. Prvo se uklanjaju mrtve ćelije i ćelijski ostaci pri maloj centrifugalnoj sili od $2000 \times g$; uklanjanje mikrovezikula i apoptotičkih tela na $10.000 - 20.000 \times g$ i zatim taloženje EV pri velikoj centrifugalnoj sili od $100.000 - 120.000 \times g$. Ultracentrifugiranjem se postiže odvajanje i prečišćavanje EV pri čemu se EV izdvajaju u vidu peleta. U pelet se dodaje sterilan PBS i ponovlja se ultracentrifugiranje. Ovaj korak može smanjiti količinu neželjenih čestica koje su zajedno izolovane sa EV. Diferencijalno UC je adekvatna metoda za uzorke velikih zapremina. Mana ove metode je što može izazvati oštećenje EV zbog primene velike centrifugale sile [68, 69].

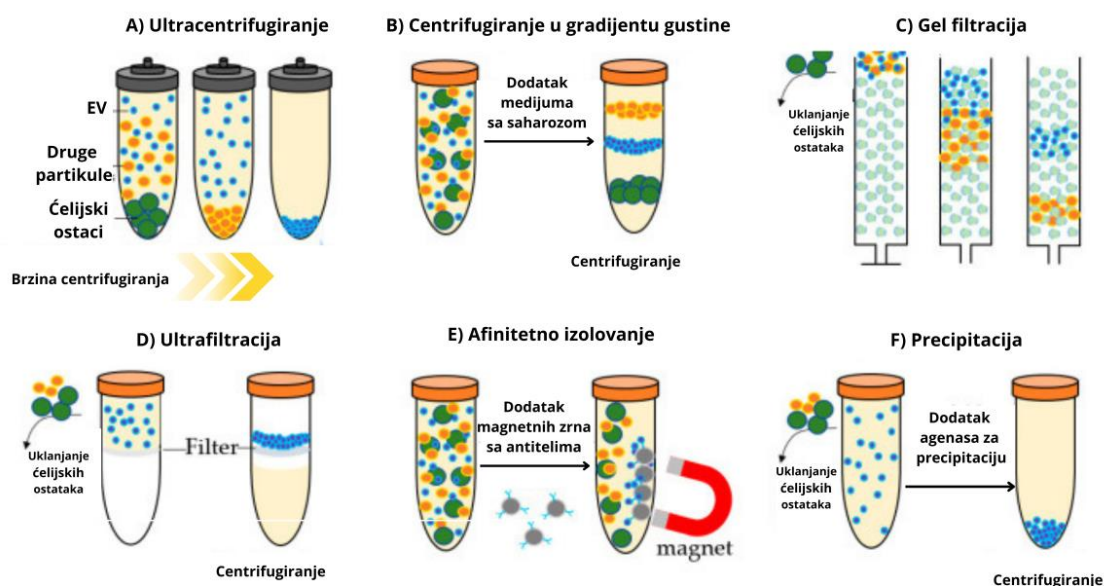
Centrifugiranje sa gradijentom gustine je modifikovana metoda ultracentrifugiranja koja koristi medijum sa unapred konstruisanim gradijentom gustine od saharoze ili jodiksana. Uzorak se stavlja u dati medijum i čestice putuju kroz gradijent sve dok ne dođu do tačke gde je njihova gustina jednaka gustini medijuma. Dobijene frakcije se razdvajaju. Zatim je potrebno izolovanje EV iz tog gradijentnog opsega gustine. Dakle, ova metoda je zahtevna, traje duže od UC. Međutim moguće je ovom metodom razdvojiti različite populacije EV [68, 70].

Metode zasnovane na odvajanju EV na osnovu veličine su ultrafiltracija i gel filtracija. Prva metoda se zasniva na odvajanju EV na osnovu veličine pomoću membrane sa porama određenih razmera. EV veće mase se zadržavaju iznad membrane, dok manje prolaze u filtrat. Prednost ultrafiltracije je što traje kratko i ne zahteva skupu opremu za rad. Međutim, tokom rada EV mogu da se polepe za filter i da se smanji prinos izolovanih EV. Samim tim, ovaj gubitak EV je problem ultrafiltracije [70, 71]. Druga metoda se zasniva na razdvajanju EV na osnovu veličine na koloni sa poroznom stacionarnom fazom. Manje partikule od EV će se sporije eluirati sa kolone. Prednost gel filtracije leži u tome što EV zadržavaju oblik, integritet i biološku aktivnost. Međutim, mana je dužina trajanja rada, a dobija se i razblažen uzorak [72].

Jedna od karakteristika EV koja se može iskoristiti za njihovo izolovanje jeste afinitet ka antitelima. Metode za izolovanje koje se zasnivaju na afinitetu ka antitelima su magnetna-imunoprecipitacija i imunoafinitetna hromatografija [70]. Magnetna-imunoprecipitacija je tehnika koja koristi specifičnost antitela i efikasnost magnetnih čestica za izdvajanje EV iz kompleksnih bioloških uzoraka. Površina magnetnih kuglica je obložena streptavidinom koji omogućava kačenje antitela. Antitela zatim specifično prepoznaju proteine na površini EV, poput CD9, CD63 ili CD81. Ovi proteini predstavljaju površinske markere EV. Nakon vezivanja EV, magnetne kuglice se izdvajaju iz uzorka pomoću magneta, čime se nepoželjne komponente uklanjaju. Elucijom EV se oslobađaju sa magnetnih čestica. Prednost metode se ogleda u jednostavnosti i brzini izvođenja i visokoj specifičnosti. Međutim, cena magnetnih kuglica i antitela je visoka [70, 73]. Afinitetna hromatografija se zasniva na imobilizaciji antitela za matriks. Ova antitela specifično prepoznaju antigene na površini EV, kao što su CD9, CD63 i CD81. Tokom izolovanja uzorak se propušta kroz kolonu sa stacionarnom fazom sa vezanim antitelima. Zahvaljujući specifičnosti antitela EV se vezuju za matriks. Nakon uklanjanja nespecifično vezanih čestica kroz ispiranje, vezane EV se eluiraju pomoću pufera koji razbijaju interakcije između antigena i antitela, omogućavajući njihovo izdvajanje u visokoj čistoći. Prednost ove metode jeste visoka specifičnost i održavanje integriteta EV nakon procesa izolovanja. Mane metode leže u ceni kolona i specifičnih antitela [74].

EV se mogu izolovati i tehnikama koje se zasnivaju na njihovoj precipitaciji. Za precipitaciju EV se koristi polietilen glikol (*engl.* polyethylene glycol, PEG), polimer koji ekskluduje vodu. Na ovaj način se smanjuje rastvorljivost EV što dalje dovodi do njihovog taloženja. EV se vrlo lako dobijaju centrifugiranjem. Ova metoda je jednostavna i moguće je koristiti velike zapremine uzoraka. Međutim, glavni nedostatak precipitacije polimerima je istovremena ko-precipitacija velikog broja kontaminanata, poput proteina i polimernih materijala. Zbog toga ova metoda nije pogodna za proteomske studije zasnovane na masenoj spektrometriji [68, 70].

Izolovanje zasnovano na mikrofluidici podrazumeva da se EV odvajaju na osnovu afiniteta ka antitelima imobilisanim na mikrofluidnom čipu. Pred-tretman nije potreban u ovom slučaju. Ova metoda je brza i ne zahteva veliku zapreminu uzorka. Međutim, čipovi su veoma složeni i skupi [75].



Slika 9. Načini izolovanja EV **A)** ultracentrifugiranje **B)** centrifugiranje u gradientu gustine **C)** gel filtracija **D)** ultrafiltracija **E)** afinitetno izolovanje **F)** precipitacija [76]

Tabela 3 sumira različite metode za izolovanje ekstracelularnih vezikula, njihove prednosti, mane, kao i količinu potrebnog uzorka.

Tabela 3. Prednosti i mane metoda za izolovanje EV [77]

Metoda	Zapremina uzorka	Prednosti	Mane
Ultracentrifugiranje (UC)	Velike zapremine (do čak stotinu ml)	Široko primenjena metoda; Moguće izolovanje različitih populacija EV	Dugo traje; Javlja se protein/EV agregati; Skupa oprema
Ultracentrifugiranje u gradijentu gustine	Zapremine od 5 do 20 ml)	Visoka čistoća izolovanih EV	Skupa oprema i reagensi; Formiranje gradijenta gustine je zahtevno; Dobija se mali prinos vezikula
Ultrafiltracija (UF)	Različite zapremine	Jednostavna i brza; Nije skupa oprema za rad	Ne dobijaju se visoko prečišćene EV; EV se lepe za membranu što može dovesti do agregacije ili gubitka uzorka
Gel filtracija	Do 10 ml	Jeftina metoda; Izolovane EV zadržavaju oblik, integritet i biološku aktivnost	Mala količina uzorka; Dugo traje; Razblaženje uzorka
Magnetna-imunoprecipitacija	Do 5 ml	Jednostavna i brza metoda; Mogućnost selektivne izolacije podtipova EVs	Visoka cena; Potrebna specifična antitela
Afinitetna hromatografija	Do 5 ml	Visoka specifičnost; Održavanje integriteta EV	Visoka cena specifičnih antitela
Precipitacija sa polimerima	Velike zapremine	Jednostavna i jeftina metoda	Ko-precipitacija kontaminanata
Mikrofluidika	Male zapremine (do 1 ml)	Brza metoda; Visoka čistoća EV	Skupi čipovi

Da bi se sprečila kontaminacija, rad sa EV bi u idealnom slučaju trebalo da se odvija u sterilnim uslovima. Kada takav rad nije moguće ispuniti, alternativa je sterilna filtracija kroz filtere sa porama od 0,2 μm . Ovi filteri su lako dostupni i mogu se primeniti tokom prečišćavanja EV, a pre njihovog čuvanja [57].

Nakon izolovanja i prečišćavanja, EV treba čuvati u odgovarajućem puferu i na temperaturi koja održava stabilnost EV. Kratkoročno čuvanje (do 48h) može se odvijati na +4°C. Dugoročno čuvanje EV se odvija na -80°C. Preporučuje se zamrzavanje u malim, pojedinačnim alikvotima kako bi se izbeglo ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje. Sledeći važan aspekt jeste posuda za čuvanje pošto se za određene površine mogu vezati EV i izmeniti im karakteristike. Krioprezervacija sa krioprotektorima se obično koristi za smanjenje osmotskog oštećenja tokom zamrzavanja EV. Izolovane vezikule su čuvane u sterilnom i filtriranom PBS, 0,9% natrijum hloridu ili medijumu ćelijske kulture. Takođe, za dugotrajno čuvanje može se razmotriti dodatak zaštitnih agenasa poput trehaloze (0,1–0,2 M). Drugo rešenje za čuvanje EV je Plasma-Lite A, koji je izotonični rastvor sa sličnim sastavom soli kao plazma, ali bez prisustva proteina ili šećera. Liofilizacija je još jedan aspekt čuvanja EV za koju se pokazalo da povećava stabilnost EV. EV iz različitih ćelijskih izvora i/ili EV subpopulacija može imati različite optimalne uslove čuvanja i stoga će uslovi čuvanja moraju optimizovani za svaki novi terapeutik zasnovan na EV [57].

Izolovane EV moraju biti okarakterisane. Tehnike karakterizacije egzozoma dele se u dve kategorije: tehnike za karakterizaciju unutrašnjeg sadržaja (kompozicijske/biohemijske) i tehnike za spoljašnju karakterizaciju (fizičke). Prva grupa tehnika identifikuje membranske proteine i oblik egzozoma, dok druga ispituje morfologiju i veličinu čestica. Ove metode su ključne za razumevanje njihovih funkcija, identifikaciju biomarkera i potencijalnu primenu u terapiji. Za karakterizaciju izolovanih EV obično se koristi više tehnika. Neke od značajnih metoda karakterizacije su sledeće: transmisiona i skenirajuća elektronska mikroskopija (transmission electron microscopy, TEM i scanning electron microscopy, SEM), dinamičko rasipanje svetlosti (*engl.* dynamic light scattering, DLS), analiza praćenja nanočestica (*engl.* nanoparticle tracking analysis, NTA), mikroskopija atomske sile (*engl.* atomic force microscopy, AFM), Western blot analiza, protočna citometrija, masena spektrometrija, sekvenciranje RNK i proteomska analiza [78]. DLS i NTA omogućavaju merenje veličine i distribucije EV. TEM u kombinaciji sa specifičnim bojenjem može pružiti strukturne detalje EV. Krio-elektronska mikroskopija takođe je pogodna za prikaz morfologije EV jer ne zahteva fiksaciju ili specifična bojenja. Kombinacija SEM i AFM koristi se za određivanje veličine, morfologije i očuvanosti strukture EV. Protočna citometrija se nedavno pokazala kao perspektivan alat za analizu površinskih markera EV [76].

2.7.4. Metode inkorporacije biološki aktivnih jedinjenja u EV

Kako bi se bioaktivna jedinjenja zaštitila od oksidacije i degradacije u cirkulatornom sistemu i mogla dostaviti u specifična tkiva, moraju biti upakovana u adekvatne membranske strukture. Bilo prirodne ili sintetske, EV se sastoje od membranskog lipidnog dvosloja u kome su lokalizovani površinski receptori i hidrofилnog jezgra u koje se pakuju željena bioaktivna jedinjenja. Načini pakovanja bioaktivnih jedinjenja obuhvataju fizičke, hemijske i biološke metode, a sve one se mogu svrstati u dva glavna pristupa: (I) aktivna ili (II) pasivna inkorporacija. Na **slici 10** su prikazane metode inkorporacije bioaktivnih jedinjenja. Ove metode rezultiraju različitom efikasnošću punjenja i stabilnosti bioaktivnih jedinjenja u EV [66].

a) Pasivna inkorporacija bioaktivnih jedinjenja

Ovakav pristup podrazumeva jednostavne, blage i neinvanzivne metode koje ne oštećuju ni membranu vezikula, kao ni samo bioaktivno jedinjenje. Međutim, ova metoda ima nisku efikasnost punjenja vezikula, što predstavlja ograničenje za samostalnu primenu. Zbog toga se pasivna inkorporacija kombinuje sa drugim metodama kako bi se poboljšala efikasnost punjenja vezikula bioaktivnim jedinjenjem. Pasivna inkorporacija može biti:

• Pasivna inkubacija bioaktivnih jedinjenja sa donorskim ćelijama

U ovom pristupu, donorske ćelije koje proizvode EV se gaje u medijumu sa biološki aktivnim jedinjenjem. Zatim se ćelije isperu i preseju u novi flask sa svežim medijumom kako bi se otklonio višak neinkorporiranog jedinjenja. Ćelije prirodno inkorporiraju ova jedinjenja u EV koje potom luče u medijum. Iz medijuma se izoluju vezikule i ispituju se na dejstvo datog bioaktivnog jedinjenja. Ova metoda je blaga jer ne zahteva posebnu manipulaciju EV. Efikasnost inkorporacije može varirati u zavisnosti od vrste molekula i tipa donorske ćelije [60].

- **Pasivna inkubacija bioaktivnih jedinjenja sa vezikulama**

EV se izoluju iz medijuma donorskih ćelija i zatim inkubiraju sa željenim jedinjenjem (npr. urolitinima ili polifenolima) u fiziološkim uslovima, pri čemu oni difunduju u EV duž gradijenta koncentracije. Uslovi inkubacije (vreme inkubacije, pH i temperatura) mogu uticati na efikasnost inkorporacije. Efikasnost punjenja zavisi od hidrofobnosti jedinjenja. Hidrofobna jedinjenja mogu da stupe u interakciju sa lipidnim slojem membrane vezikula. Prednost metode se ogleda u jednostavnosti, ali i u tome što su membrana vezikula kao i samo bioaktivno jedinjenje očuvali svoju strukturu. Njena najveća mana je niska efikasnost i nemogućnost kontrole količine jedinjenja koje se pakuje u EV (**slika 10**) [67].

- b) Aktivna inkorporacija bioaktivnih jedinjenja**

Za razliku od pasivne inkorporacije, ove metode zahtevaju dodatnu opremu (elektroporator ili ultrazvučnu sondu) kako bi se bioaktivno jedinjenje inkorporiralo u EV.

- **Elektroporacija**

Elektroporacija je metoda koja koristi elektroporator kako bi se proizveli kratki impulsi električnog polja koji privremeno destabilizuju membranu EV. Električna struja remeti fosfolipidni dvosloj vezikula, što dovodi do stvaranja privremenih pora i prolaznog stanja permeabilnosti membrane. Bioaktivnim jedinjenjima je omogućeno na taj način da prodru u unutrašnjost vezikule. EV koje su elektroporirane se inkubiraju određenim puferima kako bi im se integritet membrane obnovio. Ova metoda je efikasna posebno za molekule većih dimenzija i manje hidrofobne molekule koji ne mogu spontano da difunduju u unutrašnjost vezikula. Elektroporacija zahteva pažljivo podešavanje uslova (jačine polja i trajanja impulsa) kako bi se izbegla potencijalna oštećenja EV [79].

- **Sonifikacija**

Izolovane EV i bioaktivna jedinjenja se prvo mešaju, a zatim se koristi ultrazvučna sonda za privremenu permeabilizaciju membrane vezikula. Ova metoda omogućava da jedinjenja lako prodru u unutrašnjost vezikula. Neki lipofilni molekuli ne ulaze u unutrašnjost vezikula, već ostaju vezani za membranu. U tim situacijama imamo dve faze oslobađanja bioaktivnih jedinjenja. Iako je ova metoda efikasna postoji mogućnost oštećenja membrane EV te su potrebna optimalna podešavanja ultrazvučne snage i vremena trajanja sonifikacije [67] [80].

- **Odmrzavanje/zamrzavanje**

U ovoj proceduri, izolovane EV se inkubiraju sa bioaktivnim jedinjenjima prvo na sobnoj temperaturi u određenom vremenskom periodu, a zatim se smeša brzo zamrzne na -80°C ili u tečnom azotu i nakon toga odmrzne na sobnoj temperaturi. Ovaj proces se ponavlja najmanje 3 puta da bi se obezbedila inkapsulacija željenog jedinjenja. Međutim, metoda može da izazove agregaciju EV. Kapacitet punjenja metodom zamrzavanja/odmrzavanja je generalno niži nego kod metoda elektroporacije ili sonifikacije [60].

- **Ekstruzija**

Ekstruzija je metoda koja zahteva mini ekstruder na bazi šprica sa poroznom membranom. Izolovane EV se pomešaju sa datim bioaktivnim jedinjenjem i propuštaju se kroz membrane sa finim porama pod određenim pritiskom i kontrolisanom temperaturom. Tokom ekstruzije, membrana EV biva pokidana što omogućava molekulima da se inkorporiraju u EV. Još uvek nije utvrđeno da li mehanička sila korišćena u ovoj metodi menja svojstva membrane, kao što su zeta potencijal i strukture membranskih proteina. Mana ove metode je što može doći do deformacije membrane EV pri oštrim uslovima [80, 81].

- **Hemijska modifikacija površine**

U nekim slučajevima, bioaktivna jedinjenja se mogu kovalentno vezati za površinske proteine EV putem hemijskih reakcija (pomoću polietilenglikola ili biotina). Iako ova metoda omogućava selektivno vezivanje, može promeniti površinske karakteristike EV, što može uticati na njihovo vezivanje za ciljane ćelije [82].

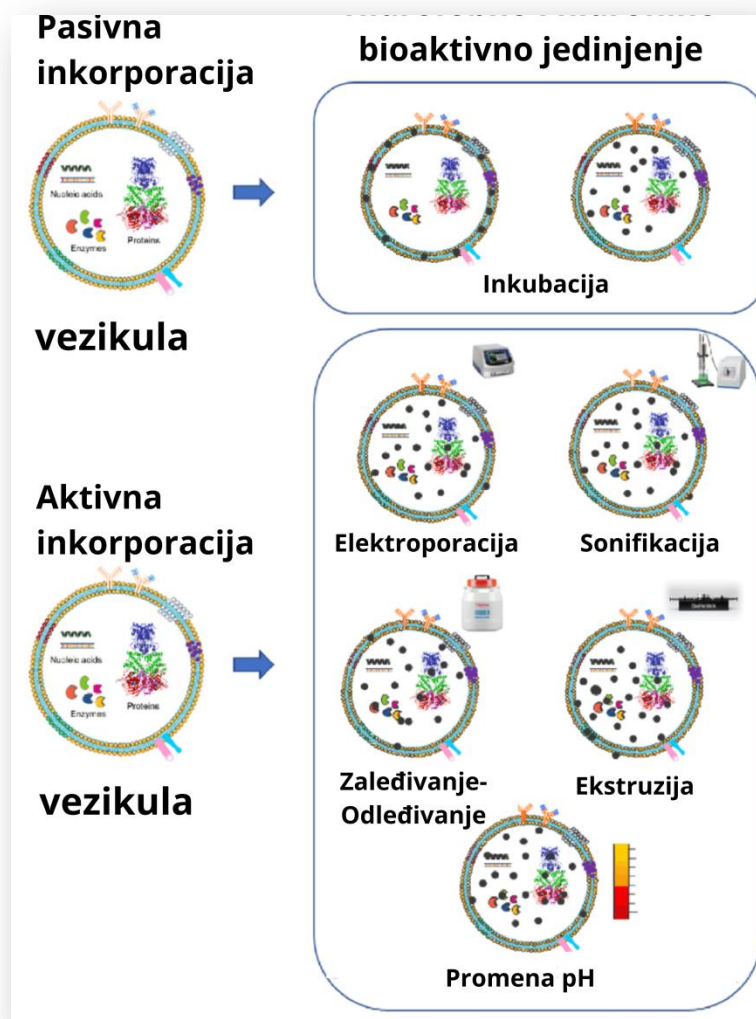
- **Fuzija sa lipidnim nanopartikulama**

Fuzija lipidnih nanočestica koje sadrže bioaktivna jedinjenja sa EV može obezbediti njihovu inkorporaciju. Ova metoda koristi slične lipide za spajanje sa membranom EV, čime se postiže stabilna inkorporacija molekula u vezikule [83].

U **tabeli 4** su sumirane prednosti i mane metoda za inkorporaciju bioaktivnih jedinjenja u EV.

Tabela 4. Poređenje metoda za inkorporaciju bioaktivnih jedinjenja u EV [84, 85]

Strategija	Metode	Prednosti	Mane
Pasivna	Inkubacija sa EV	Jednostavna metoda; Nema oštećenja strukture EV	Niska efikasnost; Nemogućnost kontrole količine upakovanog jedinjenja
	Inkubacija sa donorskim ćelijama	Relativno jednostavna metoda; Nema oštećenja strukture EV	Niska efikasnost; Jedinjenje može biti citotoksično za ćelije
	Elektroporacija	Brza i jednostavna; Pogodna za veće molekule	Oštećenje membrane EV
	Sonifikacija	Efikasna metoda	Mogućnost oštećenja EV; Agregacija EV; Nije efikasna za hidrofobne molekule
Aktivna	Odmrzavanje/Zamrzavanje	Brza i jednostavna	Mogućnost agregacije EV
	Ekstruzija	Relativno efikasna metoda	Oštećenje membrane EV
	Fuzija sa lipidnim nanopartikulama	Efiksna metoda	Generisanje pora u EV



Slika 10. Načini inkorporacije metabolita u vezikule [86]

Ekstracelularne vezikule izazivaju veliko interesovanje za isporuku bioaktivnih jedinjenja i lekova. Njihove obećavajuće prednosti, kao što su niska imunogenost i poboljšana stabilnost u cirkulaciji, čine ih sve privlačnijim za ciljanu dostavu lekova. Međutim, biogeneza, mehanizmi transporta i preuzimanja EV i dalje su nedovoljno objašnjeni. Pored toga, EV poreklom iz različitih izvora imaju različite sadržaje i samim tim mogu imati različite efekte na ćelije ili organizam domaćina. Kompleksnost biohemijskih svojstava EV dovodi do brojnih dodatnih izazova, kao što su standardizacija metoda izolovanja i prečišćavanja, efikasnost punjenja i proizvodnja za kliničku upotrebu. Isporučka bioaktivnih jedinjenja i lekova zasnovana na EV zavisi od preciznih terapijskih zahteva, odnosno hemijske prirode leka, metode punjenja EV, ciljanog mesta dostave i mehanizma delovanja. Pored svega navedenog, pokazale su ogroman potencijal u lečenju različitih malignih i neuroloških oboljenja. Iako postoje značajni izazovi u primeni EV za ciljanu dostavu lekova, ove endogene vezikule pokazuju ogroman potencijal u biomedicini kao sledeća generacija sistema nano-razmera za isporuku bioaktivnih jedinjenja i lekova [87].

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Na osnovu prethodno iznetih literaturnih podataka definisani su ciljevi ovog istraživanja:

Prvi cilj istraživanja fokusira se na ispitivanje prirode interakcija između urolitina i njegovih glukuronida sa serumskim albuminima: goveđim i humanim. Goveđi serumski albumin se često koristi kao model protein zbog svojih sličnosti sa humanim albuminom, što omogućava uvid u vezivanje, stabilnost i moguće strukturne promene BSA prilikom interakcije sa urolitinima. Priroda interakcija između urolitina i BSA ispitivaće se na jednoj temperaturi koristeći metodu fluorescentne spektroskopije, dok će molekulski doking predvideti specifična mesta vezivanja na proteinu, aminokiselinske ostatke uključene u interakcije i vrste tih interakcija koje se ostvaruju. Ovi podaci pružiće uvid u stabilnost kompleksa i moguće promene u strukturi BSA usled vezivanja urolitina.

Ispitivanje interakcija između urolitina i HSA fluorescentnom spektroskopijom na tri različite temperature omogućava uvid u termodinamičke parametre vezivanja. Sinhrona fluorescentna spektroskopija pružiće nam detaljniju analizu mesta vezivanja i promene u mikrookolini fluorofora unutar HSA nakon interakcije sa urolitinima. Infracrvena spektroskopija (FTIR) i cirkularni dihroizam (CD) će analizirati promene u sekundarnoj strukturi HSA izazvane vezivanjem urolitina, s ciljem identifikacije potencijalnih konformacionih promena proteina. Kao dopuna eksperimentalnim metodama, uradiće se molekulski doking koji će pored specifičnih mesta vezivanja urolitina na HSA dati ključne informacije o aminokiselinskim ostacima uključenim u interakcije, kao i vrstama tih interakcija. Moguće je i kvantifikovati jačinu interakcija između urolitina i proteina izračunavanjem vezivnih energija, što će pružiti uvid u stabilnost formiranih kompleksa. Kombinovanjem ovih metoda, istraživanje teži pružanju sveobuhvatnog uvida u prirodu, mehanizme vezivanja i strukturne promene koje nastaju usled interakcije serumskih albumina sa urolitinima. Na ovaj način dobijamo ključne informacije o bioraspoloživosti urolitina u organizmu.

Drugi cilj istraživanja odnosi se na razvoj metoda za inkorporaciju urolitina A, kao predstavnika klase ove grupe jedinjenja, u ekstracelularne vezikule iz komercijalnih humanih ćelijskih linija. Ekstracelularne vezikule, kao prirodni sistemi nano razmera za transport lekova, mogu značajno doprineti istraživanju terapijskog potencijala urolitina.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

Urolitini (URO A, URO B, URO C, URO D, URO AG i URO BG) dobijeni su ljubaznošću dr Gonzales Sarriasa u čistoći od 95% [88]. URO A (CAS: 1143-70-0) čistoće veće od 98 % je kupljen od Cayman Chemicals, USA za potrebe eksperimenata. Štok rastvori URO su pripremani rastvaranjem urolitina u DMSO : fosfatni pufer = 1:1, tako da konačne koncentracije budu 1 mM. U svim daljim eksperimentima u kojima se koristila smeša protein-ligand, koncentracija rastvarača dimetil sulfoksida (*engl.* dimethyl sulfoxide, DMSO) nije prelazila 0,5%.

BSA je kupljen od kompanije Sigma-Aldrich Chemical Company; St. Louis, SAD, dok je HSA (bez masnih kiselina) kupljen od CSL Behring GMBH. Oba proteina su korišćena bez dodatnog prečišćavanja. Dvostruko destilovana voda je korišćena kao rastvarač za pripremu rastvora i pufera. Sve ostale hemikalije koje se koriste u eksperimentima su analitičkog kvaliteta.

Početni rastvor BSA (25 mM) pripremljen je rastvaranjem u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,0 koji sadrži 0,15 M NaCl na osnovu molekulske težine od 66.000 Da. Osnovni rastvor BSA je čuvan u mraku na 4°C. Serija BSA rastvora, sa povećanjem koncentracija od 0 do 25 μ M, pripremana je u fosfatnom puferu za određivanje linearnog opsega koncentracije za fluorescenciju proteina. BSA rastvori su podvrgnuti merenju fluorescencije sa sledećim instrumentalnim parametrima: maksimalna talasna dužina ekscitacije (λ_{ex}) za BSA je postavljena na 280 nm, a izmerena je maksimalna talasna dužina emisije (λ_{em}) za BSA na 350 nm. Na osnovu dobijenog linearnog opsega fluorescencije za koncentracije BSA između 0 i 5 μ M, rastvor BSA koncentracija od 3 μ M je izabrana za eksperimente gašenja fluorescencije. Napravljena je serija razblaženja URO (5-30 μ M), tako što je dodavano 0,25 mL odgovarajućeg rastvora urolitina u 3 mL rastvora BSA da bi se dobio urolitin konačne koncentracije u opsegu od 0 do 25 μ M. Nakon dodavanja rastvora urolitina u rastvor BSA, promena fluorescencije je merena u roku od 1 min. Ovi eksperimenti su izvedeni dodavanjem alikvota jednake zapremine kvenčera u rastvor proteina da bi se izbegla greška razblaživanja u eksperimentima tipa titracije. Svi eksperimenti su tri puta ponovljeni.

Osnovni rastvor HSA (10 μ M) je pripremljen razblaživanjem rastvora HSA (molekulske težine 66, 500 Da) od 200 g/L u 0,1 M fosfatnog pufera pH 7,4 koji sadrži 0,15 M NaCl i čuva se na 4°C. 3 μ M HSA rastvor korišćen za eksperimente gašenja fluorescencije. 0,7 μ L rastvora URO je dodavano u rastvor HSA da bi se dobili URO rastvori sa koncentracijama u opsegu od 3 μ M do 10 μ M.

4.2. Metode

4.2.1. Merenje gašenja fluorescencije SA

Utica j prisustva URO na mikrokruženje fluorofora BSA i HSA je proučavan merenjem intenziteta fluorescencije korišćenjem spektrof luorometra FluoroMax-4 Model F-2000 (HORIBA Jobin Ivon, Japan) sa 150 W ksenonskom lampom bez ozona i termostatom za postizanje zadate temperature. Tokom eksperimenata je korišćena kvarcna kiveta od 1,00 cm (Hellma Analytics, Nemačka). Širina proreza monohromatora korišćenih za pobudu i emisiju je podešena na 5,0 nm. Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatima. Pripremljeni uzorci proteina BSA i HSA su pobuđeni na talasnoj dužini od 280 nm. To je talasna dužina ekc itacije aromatičnih (Tyr i Trp) aminokiselinskih ostataka. Fluorescentni emisioni spektri BSA i HSA su mereni u opsegu talasnih dužina od 200 do 600 nm. Širina proreza emisionog i ekscitacionog monohromatora je bila 5 nm. Emisioni spektri za BSA su praćeni na 298 K,

dok su za HSA na tri različite temperature (298 K, 303 K i 310 K). Sva merenja fluorescencije su izvršena u odnosu na slepu probu. Odgovarajuće slepe probe (pufer sa odgovarajućom koncentracijom urolitina) su oduzete da bi se ispravila pozadinska fluorescencija.

Efekat unutrašnjeg filtera se odnosi na smanjenje izmerenog intenziteta fluorescencije uzrokovano apsorpcijom ekscitovane svetlosti uzorka i naknadnom emisijom fluorescencije [89]. Da bi spektrofotometrijski podaci bili precizni, ovaj efekat se mora uzeti u obzir. Intenzitet izmerene fluorescencije može se korigovati prema jednačini (1) merenjem apsorbance na talasnim dužinama ekscitacije i emisije [40]:

$$F_{corr} = F_{obs} * 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \quad (1)$$

gde F_{corr} i F_{obs} predstavljaju intenzitete korigovane i izmerene fluorescencije, navedenim redom. A_{ex} i A_{em} predstavljaju apsorbancu na ekscitovanoj i emitovanoj talasnoj dužini. Ovaj efekat se može zanemariti i korekcija izmerene fluorescencije se ne izračunava kada je A manji od 0,07 na obe talasne dužine (A_{ex} i A_{em}) [90, 91].

A_{ex} i A_{em} su snimljeni na BioTek Synergy LX multi-mode čitaču u mikrotitarskoj pločici ukupne zapremine 300 μ L na odgovarajućoj λ (nm) i temperaturi od 298 K. 0,1 M fosfatni pufer pH 7,4 koji sadrži 0,15 M NaCl je korišćen kao slepa proba. A_{ex} i A_{em} samih URO rastvora (2 μ M - 10 μ M) i HSA-URO spektri (2 μ M - 10 μ M URO i 3 μ M HSA) su snimljeni. Dobijeni podaci za URO rastvore određenih koncentracija su oduzeti u daljoj analizi od podataka dobijenih za rastvor HSA-URO odgovarajućih koncentracija [43].

4.2.2. Stern-Volmerova (SV) i modifikovana Stern-Volmerova (SV) jednačina

Podaci o gašenju fluorescencije se analiziraju korišćenjem Stern-Volmerove jednačine (2) koja omogućava određivanje afiniteta vezivanja fluorofora za molekule kvenčera i predviđa tip mehanizma gašenja fluorescencije [92]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

U SV jednačini, F_0 predstavlja početni intenzitet emisije fluorescencije BSA ili HSA bez dodatnih liganda, dok je F intenzitet emisije fluorescencije posle dodavanja određene koncentracije kvenčera (Q) na 350 nm; k_q je konstanta bimolekularne brzine gašenja fluorescencije; K_{sv} je Stern-Volmerova konstanta gašenja; τ_0 je životni vek fluorescencije proteina, a $[Q]$ je koncentracija kvenčera. SV dijagram predstavlja zavisnost F_0/F od $[Q]$ i pokazuje mehanizam gašenja fluorescencije. Ako se dobije linearna zavisnost F_0/F od $[Q]$, onda je prisutan jedan mehanizam gašenja. Međutim, pri visokim koncentracijama $[Q]$, SV dijagram pokazuje zakrivljenost naviše, konkavno prema y-osi. Tada se koristi modifikovani Stern-Volmerov oblik jednačine (3):

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K[Q]) e^{[Q]VNa} \quad (3)$$

gde V predstavlja zapreminu sfere u kojoj je kvenčer u kontaktu sa hromoforom, odnosno zapreminu sfere delovanja, Na predstavlja Avogadrovu konstantu i ako je $K[Q]$ zanemarljivo mala vrednost, onda ova jednačina (3) ima sledeći oblik:

$$\frac{F_0}{F} = e^{(K[Q])} \quad (4)$$

Zatim se iscertava zavisnost $\ln (F_0/F)$ kao funkcija $[Q]$ i dobija se bolja linearnost SV dijagrama. Na osnovu nagiba SV dijagrama može odrediti Stern-Volmerova konstanta, K_{sv} [93].

Konstanta brzine gašenja, k_q , određena je primenom jednačine (5):

$$k_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (5)$$

Vrednost k_q je dobijena korišćenjem SV konstante i srednje literaturne vrednosti životnog veka fluorescencije za HSA u odsustvu bilo kakvih kvenčera fluorescencije ($t_0 = 10^{-8}$ s) [94].

Dvostruka logaritamska jednačina (6):

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log K_b + n \log [Q] \quad (6)$$

je korišćena za dobijanje vrednosti broja mesta vezivanja (n) i konstante vezivanja (K_b) iz vrednosti nagiba i y-presecanja, redom.

U slučaju formiranja nefluorescentnog kompleksa između proteina i liganda, konstanta vezivanja (K_b) se izračunava na osnovu sledeće jednačine (7):

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log K_b + n \log \left\{ [Q]_0 - n \frac{(F_0 - F)[P]_0}{F_0} \right\} \quad (7)$$

gde $[Q]_0$ i $[P]_0$ predstavljaju ukupnu koncentraciju kvenčera, u ovom slučaju urolitina i ukupnu koncentraciju proteina, odnosno HSA, redom [30].

4.2.3. Termodinamički parametri HSA-URO kompleksa

Pored računanja navedenih konstanti (K_{sv} , k_q i K_b), bitno je izračunati i termodinamičke parametre HSA-URO kompleksa. Termodinamički parametri kao što su promena entalpija (ΔH) i promena entropije (ΔS) tokom procesa formiranja HSA-URO kompleksa, mogu se izračunati na osnovu Van't Hoffove jednačine (8):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (8)$$

gde je K_b konstanta vezivanja iz jednačine (7), T je apsolutna temperatura izražena u K, a univerzalna gasna konstanta R je $8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

Za izračunavanje promene Gibsove slobodne energije (ΔG) formiranja kompleksa HSA-URO pod navedenim uslovima ($\text{pH} = 7,4$; $T = 298 \text{ K}$, 303 K i 310 K) korišćena je sledeća jednačina (9):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (9)$$

4.2.4. Snimanje sinhronih fluorescentnih spektara HSA-URO kompleksa

Sinhroni spektri fluorescencije su snimani na uređaju FluoroMax-4 Model F-2000 (HORIBA Jobin Yvon, Japan) u opsegu talasnih dužina od 240 nm do 400 nm, sa kvarcnom kivetom dužine puta od 1 cm i zapremine 700 μ L. Širina proreza monohromatora korišćenih za ekscitaciju i emisiju je bila 5,0 nm. Sinhroni spektri su snimani na temperaturi od 298 K i pri istim koncentracijama proteina (3 μ M HSA) i liganda (3 μ M - 10 μ M URO) kao i osnovni fluorescentni spektri. Opseg sinhronog skeniranja bio je od $\lambda_{\text{ex}} = 240$ nm do $\lambda_{\text{em}} = 255$ nm, pri čemu je razlika u talasnoj dužini ($\Delta\lambda$) bila 15 nm za tirozinske aminokiselinske ostatke. Takođe je urađeno i sinhrono skeniranje u opsegu od $\lambda_{\text{ex}} = 240$ nm do $\lambda_{\text{em}} = 300$ nm, gde je razlika u talasnoj dužini ($\Delta\lambda$) bila 60 nm za triptofanske aminokiselinske ostatke. Sinhroni spektri su snimljeni kako bi se istražile promene u mikrokruženju ovih aminokiselina.

4.2.5. Snimanje FT-IR spektara HSA-URO kompleksa

Infracrveni spektri HSA su dobijeni korišćenjem Nicolet Summit 6700 FT-IR spektrometra (Thermo Fisher Scientific, SAD), sa atenuiranom totalnom refleksijom (ATR) uz dodatak 30 μ M URO. Mali alikvoti od 1,5 μ L sa koncentracijom proteina od 1 mg/mL stavljeni su na kristal dijamanta, a rastvarač je uklonjen pomoću struje argona. Kompozitni spektri srednjeg IR (400–4000 cm^{-1}) dobijeni su pomoću DTGS TEC (deuterisani triglicin sulfat sa termoelektričnim hlađenjem) detektora i KBr razdelnika zraka kroz 64 skeniranja. Pozadinska apsorpcija je automatski podešena u spektrima. Dve dodatne korekcije su napravljene korišćenjem OMNIC programa: korekcija osnovne linije i automatska ATR korekcija.

4.2.6. Snimanje CD spektara HSA-URO A kompleksa

CD spektri su snimljeni u dalekoj UV oblasti (190–260 nm) na Jasco J-815 spektrometru (JASCO, Japan) korišćenjem ćelije sa dužinom putanje od 0,5 mm. Uslovi snimanja spektara su: konstantni protok azota na sobnoj temperaturi 25°C (298 K), brzina skeniranja od 50 nm/min i brojem akumulacija od tri skeniranja.

Pufer za pripremu uzoraka je 0,01 M fosfatni pufer pH 7,4. Pufer ne sme da sadrži veliku koncentraciju hloridnih jona (NaCl) jer apsorbuju u dalekoj UV oblasti [48]. Sniman je spektar kako samog HSA, tako i samog URO A, kao i HSA-URO A kompleksa. Koncentracija HSA je održavana na 3 μ M, a koncentracije URO A su bile 6 μ M i 30 μ M. Pufer je oduzet od svih CD spektara. Prosečni elipticitet po aminokiselinskom ostataka (MRE) samog HSA i HSA-URO A kompleksa izračunata je korišćenjem sledeće jednačine (10) [47]:

$$MRE = \frac{\theta_{\text{obs}}}{10 * n * l * C_p} \quad (10)$$

gde je izmereni cirkularni dihiroizam izražen u mdeg, C_p molarna koncentracija proteina, n je broj aminokiselinskih ostataka proteina i l je dužina puta u cm. U slučaju HSA ovi parametri iznose: C_p je 3 μ M, n iznosi 585, dok je dužina puta 0,05 cm. CD rezultati su izraženi kao prosečna eliptičnosti po

ostatku (MRE) u $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$. Izračunate vrednosti MRE su korišćene za dalje izračunavanje ukupnog sadržaja α -heliksa u HSA korišćenjem jednačine (11) [47]:

$$\% \alpha - \text{heliksa} = \frac{MRE_{222} - 2340}{30300} \times 100 \quad (11)$$

4.2.7. Molekulski doking BSA-URO kompleksa

Inicijalne strukture liganda su preuzete sa PubChem-a sajta (URO A PubChem CID: 5488186; URO B PubChem CID: 5380406; URO AG PubChem CID: 124202103, i URO BG PubChem CID: 101495881) i njihova geometrija je bila potpuno optimizovana sa B3LIP [95, 96] teorijom funkcionalne gustine koristeći standardni 6-311 + + G (d,p) osnovni skup. Svi kvantno hemijski proračuni su izvršeni sa Gaussian09 programskim paketom [97].

Molekulsko modelovanje kompleksa URO-BSA izvedeno je korišćenjem 3D kristalne strukture BSA (PDB ID: 4F5S, lanac A [98]) preuzete iz Proteinske banke podataka (*engl.* Protein Data Bank, PDB). Svi heteroatom (trietilen glikol i voda) su uklonjeni iz strukture proteina i status protonovanja svakog titrabilnog amino-kiselinskog ostatka je procenjen korišćenjem konačne razlike Poisson-Boltzmann-ovog kontinuuma elektrostatičkog modela implementiranog u programu H + +3.0 [99]. Konačno, struktura proteina je optimizovana u CHARMM programu (verzija c35b1) korišćenjem CHARM22 proteinskog polja sile [100] sa 5000 koraka optimizacije (2000 koraka sa algoritmom najstrmijeg spuštanja praćenog sa 3000 koraka sa Njutn-Rafsonovim algoritmom).

Dalje su optimizovane strukture proteina i liganada podvrgnute analizi sa AutoDockTools (verzija 1.5.7. Dec_19_18) programa za pripremu molekulskog dokinga. Svi proteinski ostaci su bili održani rigidnim i sve rotirajuće ligandske veze su postavljene tako da se rotiraju slobodno tokom proračuna.

Studije molekulskog dokinga su sprovedene u AutoDockVina programu (verzija 1.1.2) [101]. Mala rešetkasta kutija, sa dimenzijama $24 \times 24 \times 24$ Å, korišćena je za smeštaj liganda kako bi se slobodno kretali tokom molekulskog dokinga. U cilju pokrivanja cele površine i zapremine BSA, rešetkasta kutija se pomerila preko pravougaone matrice koja sadrži protein sa tačkama 8 Å udaljenosti, tako da je proizvedeno ukupno 960 rezultata dokinga za svaki ligand. Iz svakog dobijenog rezultata, 9 načina vezivanja sa najviše bodova funkcije je zadržano za dalju analizu.

4.2.8. Molekulski doking HSA-URO kompleksa

Kristalne strukture HSA bez liganda, HSA vezanog za miristinsku kiselinu (FA-HSA), hem-Fe(III)- i miristinska kiselina vezana za HSA (hem-HSA), su preuzete iz Proteinske baze podataka RCSB (www.rcsb.org) [102] i imaju PDB kod 1BM0, 8RCP and 1N5U, redom [103-105]. Trodimenzionalne (3D) strukture URO A-D, URO AG i URO BG su izgrađene korišćenjem ChemBio3D Ultra 12.0 praćene minimizacijom MM2 energije polja sile [106]. Priprema strukture proteina (protonovanje, uklanjanje molekula vode, podešavanje atoma i tipova veza, kao i prilagođavanje fleksibilnosti aminokiselinskih bočnih lanaca i ostataka) obavljena je korišćenjem GOLD (*engl.* Genetic Optimization for Ligand Docking) programa implementiranog u CSD-Enterprise Suite verziji programa 2022.3.0. [107-110].

Sa namerom da se pronađe bioaktivna konformacija liganada, konformaciona sloboda ligandnih struktura podrazumevala je punu raspodelu i rotaciju uglova torzije, kao i okretanje grupa na uglovima prstenova. Svaki ligand je ukotvljen za mesta vezivanja na slobodnom HSA molekulu: u Sudlow I mestu i u međudomenskoj šupljini (*engl.* cleft binding site) u generisanoj šupljini radijusa od 10 Å. Za FA- i hem-HSA, ligandi su ukotljeni za FA8 mesto i međudomensko vezivno mesto u generisanoj šupljini radijusa od 10 Å. Predviđanje poza i procena afiniteta vezivanja urađeni su korišćenjem CHEMPLP scoring funkcije sa pokretanjem 50 genetskih algoritamskih ciklusa. Srednja kvadratna devijacija (*engl.* root mean square deviation, RMSD) između odgovarajućih atoma dva proteinska lanca je uobičajena mera sličnosti između dve strukture proteina. RMSD < 2,0 Å odgovara dobrim rešenjima za doking. Rezultati koji se razlikuju u RMSD za manje od 1.0 Å u svim atomima liganda su grupisani zajedno. Najbolja konformacija izračunata korišćenem GOLD uzeta je za dalju analizu. Distribucija produktivnih poza dobijenih doking analizom klastera pomoću RMSD od 1,0 Å je prikazana na slikama P1-P3 u Prilogu.

Efikasnost liganda (LE) je izračunata prema sledećoj jednačini:

$$LE = \frac{E_{tot}}{n} \quad (12)$$

gde je E_{tot} slobodna energija vezivanja izražena u kcal/mol, dok n je broj teških atoma u ligandu. Broj teških atoma za svako jedinjenje izračunato je iz molekularne formule: URO A: 17 teških atoma; URO B: 17 teških atoma; URO AG: 20 teških atoma; URO BG: 21 teški atom; URO C: 18 teških atoma; URO D: 19 teških atoma.

4.2.9. Statistička analiza

Statistička analiza je izvršena pomoću Graph Pad Prism verzije 6 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Sva merenja su urađena u triplicatu, a dobijeni podaci izraženi su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija u analizi gašenja fluorescencije. K_{sv} vrednosti su izračunate iz linearne regresije. Linearnu regresiju smo uradili tako što smo na X-osu uneli podatke za odgovarajuće koncentracije URO, dok su na Y-osu uneti podaci za vrednosti F_0/F u vidu srednje vrednosti $\pm$ greška merenja. Kada se uradi linear fit, dobija se jednačina prave $Y = aX + b$, u kojoj a predstavlja nagib, dok b predstavlja presek sa Y-osom. Dobijene vrednosti za a iz jednačine predstavljaju K_{sv} vrednosti. Takođe iz jednačine se dobija koeficijent determinacije (R^2) koji predstavlja statističku meru koja pokazuje koliko dobro regresioni model objašnjava varijabilnost zavisne promenljive (Y) u odnosu na nezavisnu promenljivu (X). Što je R^2 bliže jedinici to znači da je linearnost veća. Idealan slučaj jeste kada R^2 iznosi 1, tada sve tačke leže na regresionoj pravoj. ANOVA se koristi za određivanje statističkog značaja, dok je Tukey test korišćen za poređenje izmerenih vrednosti između sebe. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće $p < 0.05$.

4.3. Inkorporacija URO A u ekstracelularne vezikule

4.3.1. Gajenje HEK 293 ćelija

Sve podloge za rast ćelija, kao i neophodni rastvori za rad su čuvani u frižideru, a pre upotrebe su termostatirani u vodenom kupatilu na 37°C. Rad sa ćelijskim kulturama se obavlja u sterilnim uslovima, sa sterilnim rastvorima, posuđem i plastikom. Ćelije HEK 293 su uzgajane u hranljivom medijumu (*engl.* Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) sa 10% FBS i 100 U/mL penicilina i

100 mg/mL streptomycina. Čelije su uzgajane na 37°C u atmosferi od 5% CO₂ / 95% vazduha pri konstantnoj vlažnosti. Zamena hranljivog medijuma je vršena na svaka 2 do 3 dana sve dok čelije nisu uspostavile konfluenciju od 80%. Nakon toga, medijum u kome su rasle čelije je uklonjen i čelije su isprane fiziološkim rastvorom puferisanim fosfatom (*engl.* phosphate-buffered saline, PBS). Čelijama je dodat DMEM medijum bez FBS došlo je do lučenja ekstracelularnih vezikula (EV). Čelije su u medijumu bez FBS uzgajane još 24 h, a zatim su kondicionirani supernatanti čelijske kulture sakupljeni u sterilne polipropilenske (PP) epruvete od 50 ml. Čelije su uklonjene centrifugiranjem 30 min na 300 x g na 4 °C. Supernatanti su prebačeni u sterilne epruvete i korišćeni za hromatografsko odvajanje EV [74].

4.3.2. Prečišćavanje vezikula iz medijuma HEK 293 čelijske kulture

Pet antitela (H1, H6, G2, D5 i B1) koja imaju samo teške lance (*engl.* variable heavy domain of heavy chain, VHH) su dobijena na osnovu protokola datog u radu [74]. Ova antitela su korišćena za aktivaciju metakrilatnog polimera na osnovu protokola iz rada [74]. Odmereno je 0,5 mL aktiviranog polimera. Polimeru se blokiraju preostala slobodna mesta vezivanja tako što se inkubira sa 5% (v/v) obranim mlekom u PBS 30 minuta na sobnoj temperaturi. Polimer se ispira sa PBS. Nakon toga je spreman za dalju upotrebu.

Kondicionirani medijum HEK 293 čelijske kulture (50 mL) je filtriran kroz centrikon od 100 kDA (GE Healthcare) da bi se smanjila zapremina uzorka na 1 mL. Koncentrovani uzorak je pomešan sa polimerom i inkubiran 1 h uz lagano mešanje na sobnoj temperaturi. Nevezani proteini su ispirani PBS rastvorom. Zatim su vezane EV eluirane sa rastvorom 200 mM glicina pH 2,2. U polimer sa uzorkom se doda 400 µL rastvora glicina i inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano mešanje. Eluat je neutralisan dodatkom 1 M Tris HCl, pH 9,1. Nakon prvog eluiranja, polimeru se dodaje još 400 µL pufera za eluiranje i inkubira dodatnih 30 min pod istim uslovima. Eluat iz ovog drugog koraka se spaja sa eluatom iz prvog koraka za dalji rad [74].

Koncentracija EV proteina je određena sa Micro BCA Protein Kitom (Thermo Scientific TM) korišćenjem BSA kao standarda. Raspodela veličine i broj čestica je određen na NanoSight LM10 sistemu (Malvern Preanalytical, Malvern, UK) analizujući ~500 µL EV preparata izolovanog afinitetnom hromatografijom razblaženog u PBS (~10 puta). Pojedinačni video snimci od 60 s za svaki uzorak su uzeti korišćenjem maksimalnog pojačanja kamere i analizirani softverom za praćenje čestica NanoSight da bi se odredila veličina i gustina čestica [74].

4.3.3. Priprema rastvora i snimanje UV spektra URO A

URO A je kristalna supstanca, žute boje koja se dobro rastvara u organskim rastvaračima (metanol, MetOH; dimetil-sulfoksid, DMSO). Da bi se rastvorio u puferu, prvo mora da se napravi štok rastvor u navedenim rastvaračima i zatim se razblažuje puferom. Vodeni rastvori mogu da stoje samo 24h. Neophodno je praviti sveže rastvore pre upotrebe.

Štok rastvor URO A (1 mM) je napravljen u metanol:PBS (1:1). Ovaj rastvor je razblažen PBS rastvorom kako bi se napravila serija rastvora.

Napravljena je standardna serija rastvora URO A koncentracija: 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM i 100 µM. Meren je UV spektar URO A rastvora u opsegu od 200 do 400 nm na BioTek

Synergy LX multi-mode čitaču u mikrotitrarskoj pločici ukupne zapremine 300 μ L na temperaturi od 298 K. Kao slepa proba je korišćen rastvor PBS:metanol u odnosu 1:1.

4.3.4. Punjenje ekstracelularnih vezikula sa URO A

Prethodno napravljeni rastvori URO A su korišćeni za punjenje izolovanih ekstracelularnih vezikula metodom pasivne inkubacije u trajanju od 24 časa na sobnoj temperaturi u mraku uz blago mešanje. U smeši se nalazi 20 % rastvora URO A i 80 % vezikula. Nakon inkubacije, EV su odvojene od slobodnog URO A tako što su propuštene kroz centrikone kao što je Amicon Ultra-4 ml (Millipore) sa membranom (*engl.* molecular weight cut-off, MWCO) od 10 kDa. Uzorak je centrifugiran 10 min na 3 000 obrtaja/min. Pošto je URO A manje molekulske mase, on će proći kroz membranu centrikona, dok će EV sa inkorporiranim URO A zaostati iznad membrane. Kao negativna kontrola EVs su inkubirane sa PBSom.

Prečišćene EV koje sadrže URO A mešaju se sa etil acetatom (1:4) zakiseljenim sa 0,1% mravljom kiselinom. Zatim se smeša meša 1 min. Nakon toga sledi tretman ultrazvučnom sondom 5 min, pri čemu se uzorak drži na ledu. Tako hladan uzorak se centrifugira na 10.000 g tokom 5 min na 4°C, kako bi se odvojile vodena i organska faza. Organska faza je sakupljena i redukovana do suva u brzom vakuum koncentratu (slika 11). Ekstrahovani i upareni uzorci se rastvore u 200 μ L metanola, filtriraju kroz 0,22 μ m (*engl.* polyvinylidene difluoride, PVDF) filter i analiziraju tečnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (*engl.* liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) [67].



Slika 11. Šematski prikaz gajenja ćelija, sakupljanja medijuma sa EV i punjenja EV sa URO A

4.3.5. LC-MS analiza

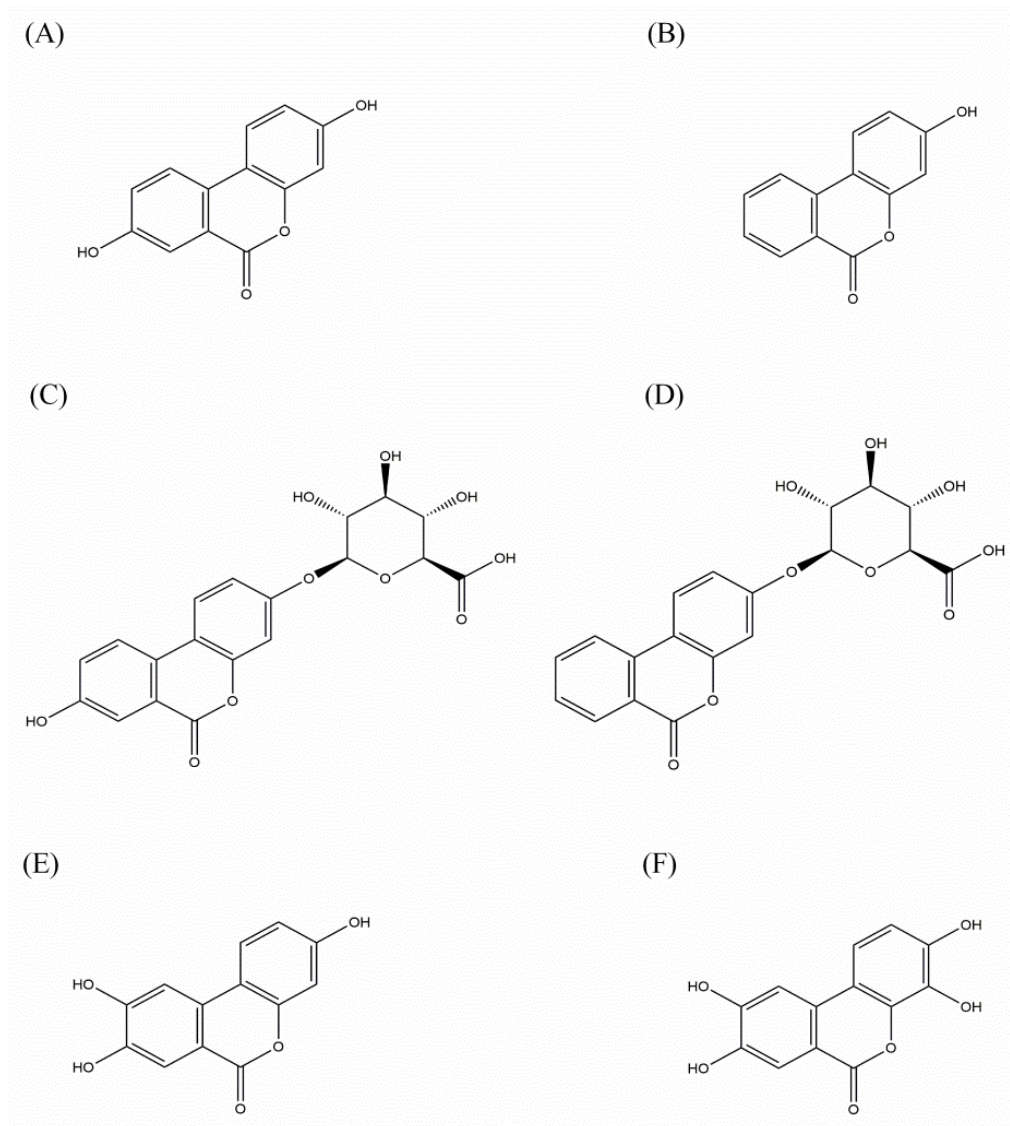
Hemijski profil ekstrakata URO A analiziran je tečnom hromatografijom kuplovanom sa masenom spektrometrijom. Korišćen je tečni hromatograf proizvođača ACQUITY UPLC H-Class, kuplovan sa MS uređajem Waters ACQ-TQD sa elektrosprej jonskim izvorom. Hromatografsko razdvajanje je izvedeno na koloni ACQUITY UPLC BEH C18 (dužine 50 mm, unutrašnjeg prečnika 2.1 mm, sa veličinom čestica prečnika 1,7 μm).

Injektovano je 200 μL uzorka. Sastav mobilne faze: mobilna faza A je voda, a mobilna faza B je metanol. Eluiranje se izvodilo u gradijentnom režimu: 0 - 1 min (5% B), 1 - 4 min (5% - 95% B), 4 - 4.5 min (95% B), 4.5 - 5 min (95% - 5% B), 5 min (5% B), uz konstantan protok od 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Vreme trajanja elucije je iznosilo 6 min. Kolona je temperirana na 40 $^{\circ}\text{C}$ (eluat je nakon kolone hlađen na temperaturu detektora).

Maseni spektrometar je bio opremljen sa ESI interfejsom koji je operisao u pozitivnom režimu jonizacije. Vrednosti parametara su bili: elektrosprej voltaža: 1.0 kV; tip MS/MS skeniranja: MRM; kolizioni gas: Argon; MRM ion(s): m/z 229>128; koliziona energija: 34 V; MRM ion(s): m/z 229>128; koliziona kvantifikacija URO A je izvršena korišćenjem kalibracione krive standarda URO A, opsega koncentracije od 0 μM do 150 μM .

5. REZULTATI

Urolitini su bioaktivni metaboliti elagitanina, jedinjenja koje se nalazi u voću poput nara, jagoda i malina. Najznačajniji među njima su urolitin A, B, C i D, koji se formiraju delovanjem crevne mikrobiote nakon unosa elagitanina (**slika 12 A), B), E) i F)**). Svaki od ovih urolitina ima različitu strukturu. Konjugovani oblici urolitina A i B, kao što su njihovi glukuronidi, nastaju u jetri procesom glukuronidacije, gde se na molekule urolitina vezuje glukuronska kiselina (**slika 12 C) i D)**). Kroz ovu konjugaciju, urolitini postaju hidrosolubilni, što im omogućava bolje kretanje i eliminaciju iz tela. Njihova različita struktura utiče na vezivanje za serumske albumine i igra ključnu ulogu u transportu ovih bioaktivnih molekula kroz krvotok. Ova interakcija je značajna jer utiče na stabilnost, distribuciju, bioraspoloživost i eliminaciju urolitina u organizmu.



Slika 12. Hemijske strukture urolitina su prikazane sledećim redosledom: **A)** Urolitin A (URO A); **B)** Urolitin B (URO B); **C)** Urolitin A glukuronid (URO AG); **D)** Urolitin B glukuronid (URO BG); **E)** Urolitin C (URO C); **F)** Urolitin D (URO D)

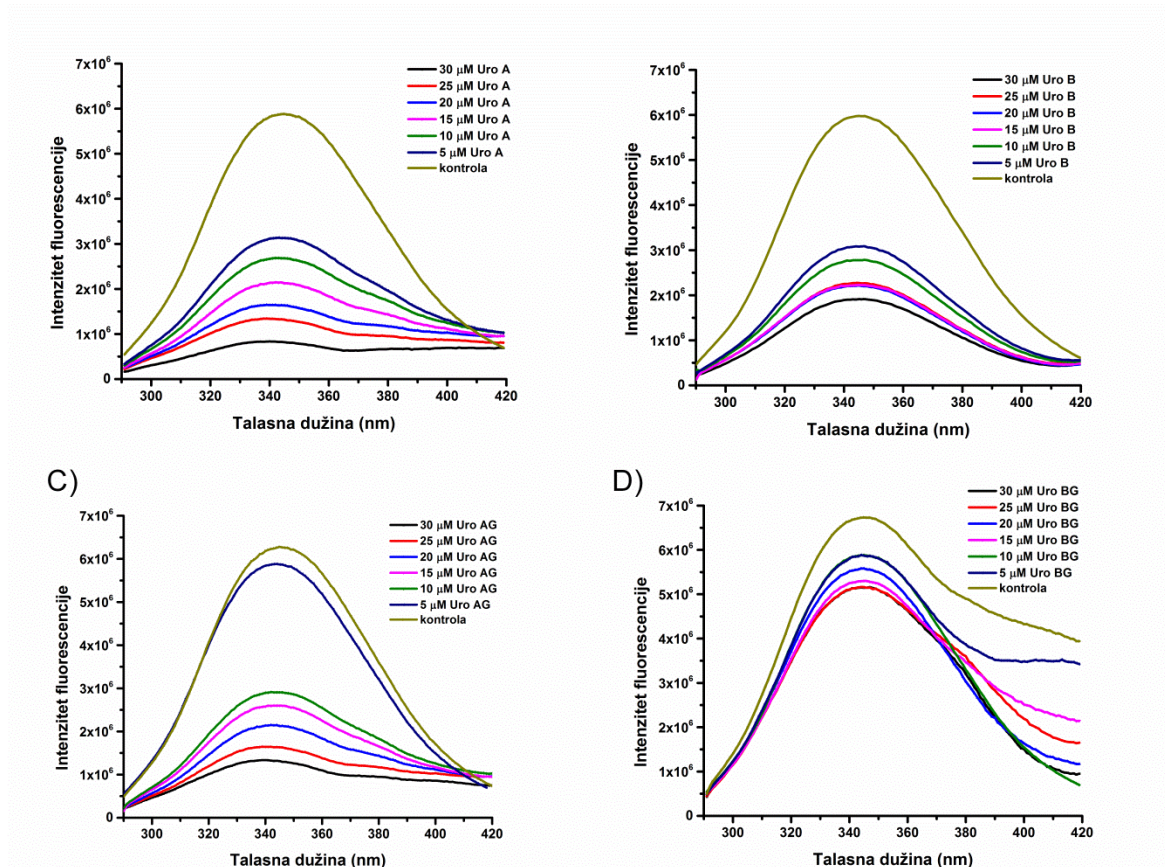
5.1. Gašenje unutrašnje fluorescencije serumskih proteina urolitinima

Serumski proteini imaju unutrašnju fluorescenciju koja potiče od prisustva aromatičnih aminokiselinskih ostataka. Kod BSA fluorescencija potiče od prisustva triptofanskog ostatka, dok kod HSA potiče od prisustva triptofanskog i tirozinskog, sa karakterističnim pikom fluorescencije na oko 350 nm. Glavna fluorofora BSA je triptofanski ostatak na poziciji (Trp 213), dok se kod HSA ovaj ostatak nalazi na poziciji 214 (Trp 214). Vezivanje polifenolnih jedinjenja, kao što su urolitini, za BSA i HSA dovodi do suptilnih strukturnih promena, posledično menjajući mikrookruženje fluorofore proteina i gaseći njegovu intrinzičnu fluorescenciju [20].

5.1.1. Gašenje unutrašnje fluorescencije BSA

Konformacione promene u molekulu BSA praćene su promenom unutrašnje fluorescencije nakon dodavanja slobodnih i konjugovanih URO. Ova merenja pokazuju da dolazi do promena u emisionim spektrima triptofanskih ostataka BSA nakon vezivanja liganda i predstavljaju efikasan način u proceni kako svojstva datog liganda utiču na interakciju sa proteinom.

Na **slici 13** su prikazani emisioni spektri fluorescencije BSA praćeni pri fiziološkom pH u prisustvu rastuće koncentracije slobodnih (URO A i URO B) i konjugovanih (URO AG i URO BG) URO. Povećanje koncentracije svakog urolitina je dovelo do smanjenja intenziteta fluorescencije, ali ne i do pomeranja maksimuma emisije λ_{em} koji se uočava na 350 nm. Emisioni spektri 3 μ M BSA pre dodavanja URO su označeni kao kontrola i predstavljeni su maslinasto zelenom bojom linija, dok se koncentracije svakog urolitina povećavaju od 5, 10, 15, 20, 25 do 30 μ M i prikazane su na **slici 13** teget, zelenom, roze, plavom, crvenom i crnom spektralnom linijom, respektivno. Prikazani spektri su automatski korigovani oduzimanjem spektra odgovarajućeg urolitina.

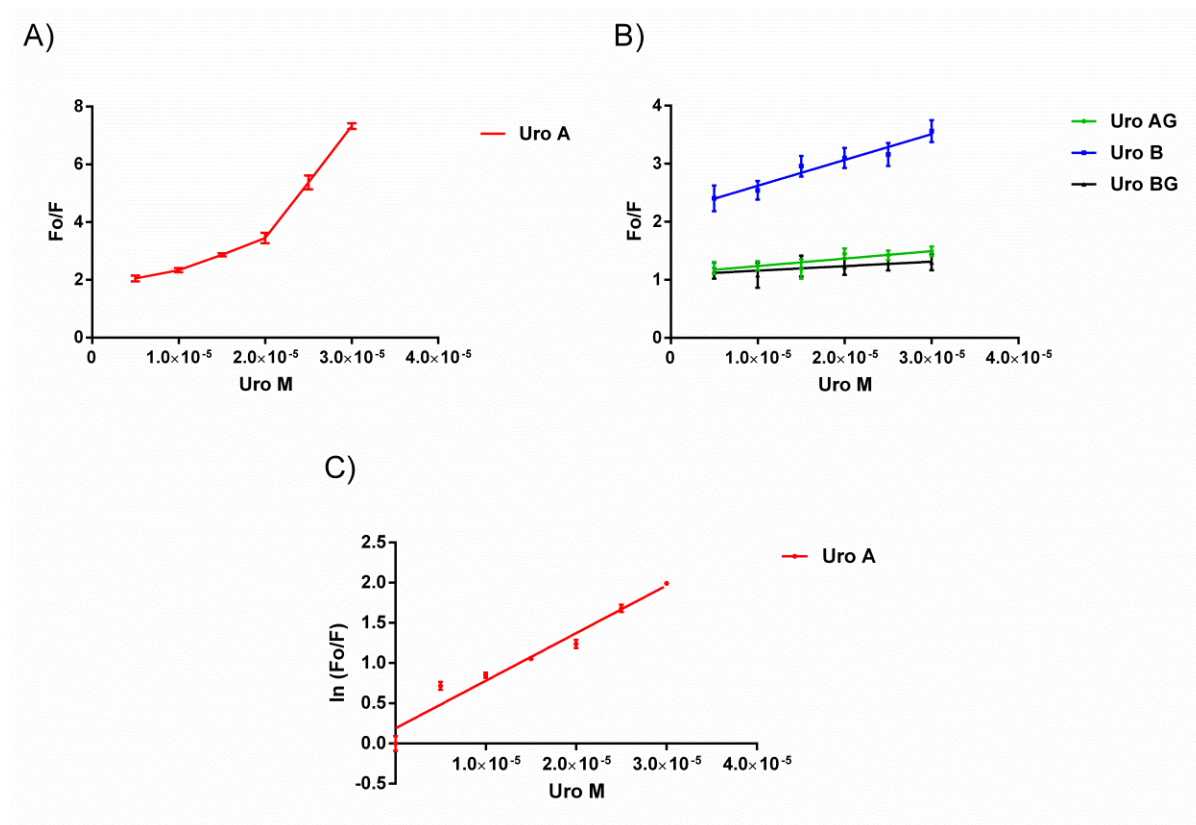


Slika 13. Fluorescentni emisijski spektri BSA u odsustvu i prisustvu urolitina **A)** URO A **B)** URO B **C)** URO AG **D)** URO BG na ekscitacionoj talasnoj dužini $\lambda_{ex} = 280$ nm. Uslovi: pH = 7.4, T = 298 K. Koncentracija BSA je iznosila 3 μ M, gde se koncentracija URO povećava od 5 μ M do 30 μ M u inkreментu od 5 μ M.

Dobijeni rezultati pokazuju da promene u mikrookruženju triptofana zavise od strukture dodatog kvenčera fluorescencije. URO A i URO B gase fluorescenciju triptofana za $86,3 \pm 0,7$ % i $71,9 \pm 1,6$ %, respektivno pri koncentraciji od 30 μ M. Glikozilovani URO (URO AG i URO BG) pokazuju manje izražen efekat na gašenje fluorescencije triptofana od njihovih odgovarajućih aglikona. URO AG gasi fluorescenciju za $33,1 \pm 2,3$ %, a URO BG za $23,1 \pm 0,3$ % pri koncentraciji od 30 μ M. Aglikoni urolitina, URO A i URO B, pokazuju skoro identičan efekat na gašenje fluorescencije BSA. U korišćenom opsegu koncentracija urolitina linearno gašenje fluorescencije triptofana se primećuje, ali ne dostiže nulu. Nasuprot tome u odnosu na aglikone, URO AG i URO BG pokazuju slabije vezivanje za BSA na šta ukazuje slabije gašenje fluorescencije, dostižući samo deo efekta aglikonskih parova.

Slika 14 prikazuje Stern-Volmerove dijagrame gašenja fluorescencije BSA različitim koncentracijama slobodnih i konjugovanih URO. Za primenjen koncentracioni opseg URO A, Stern-Volmerov dijagram nije linearan već je zakrivljen nagore, konkvavno na Y-osu (**slika pod 14 A**). Linearni Stern-Volmerovi dijagrami su dobijeni za primenjene koncentracije URO B i konjugovane URO AG i URO BG. Ovakvi rezultati ukazuju na prisustvo jednog mehanizma gašenja fluorescencije (**slika pod 14 B**).

Dobijeni rezultat za URO A pak ukazuje da bi BSA mogao biti ugašen kombinacijom statičkog i dinamičkog mehanizma, poznatog kao model „sfere delovanja”. Prema ovom modelu postoji sfera određenog volumena oko fluorofora unutar koje kvenčer izazva gašenje fluorescencije sa verovatnoćom jednakom jedinici. Gašenje se dešava kada se kvenčer nalazi u neposrednoj blizini fluorofore proteina u trenutku pobuđivanja. Ipak, u ovom modelu ne dolazi do formiranja stabilnog kompleksa između fluorofore i kvenčera u osnovnom stanju. Modifikovani oblik Stern-Volmerovog dijagrama se koristi za analizu gašenja fluorescencije BSA kada su prisutni i statički i dinamički mehanizmi gašenja (**slika pod 14 C**).



Slika 14. Stern-Volmerov dijagram koji opisuju gašenje fluorescencije BSA ($3 \mu\text{M}$) na pH 7,0 u prisustvu različitih koncentracija A) URO A B) URO AG, URO B i URO BG C) Modifikovani oblik Stern-Volmerovog dijagrama koji opisuje gašenje fluorescencije BSA ($3 \mu\text{M}$) na pH 7,0 u prisustvu različitih koncentracija URO A

Tabela 5 sadrži izračunate konstante: Stern-Volmerovu (K_{SV}) i bimolekularnu konstantu gašenja fluorescencije (k_q) pri fiziološkom pH i 298 K. URO A, za razliku od URO B i njihovih konjugata URO AG i URO BG, je reaktivniji u gašenju BSA fluorescencije. Bimolekularna konstanta gašenja (k_q) pokazuje efikasnost gašenja i omogućava da se proveri da li se gašenje javlja kao posledica nastajanja kompleksa protein-ligand koji utiče na mikrokruženje triptofana.

Od vrednosti k_q zavisi koji će tip mehanizma gašenja biti prisutan. Ukoliko vrednost konstante iznosi $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ biće prisutno dinamičko gašenje. Dobijene k_q vrednosti za ispitivane URO su 100 do 400 puta veće (**Tabela 5**), što ukazuje na stabilan kompleks BSA-URO. Statičko gašenje je dominantno u ovom sistemu.

Tabela 5. Stern-Volmerove (K_{SV}) i bimolekularne (k_q) konstante gašenja za interakcije URO sa BSA. Vrednosti sa različitim gornjim indeksom se značajno razlikuju ($P < 0.05$); vrednosti sa istim gornjim indeksom se ne razlikuju značajno ($P > 0.05$)

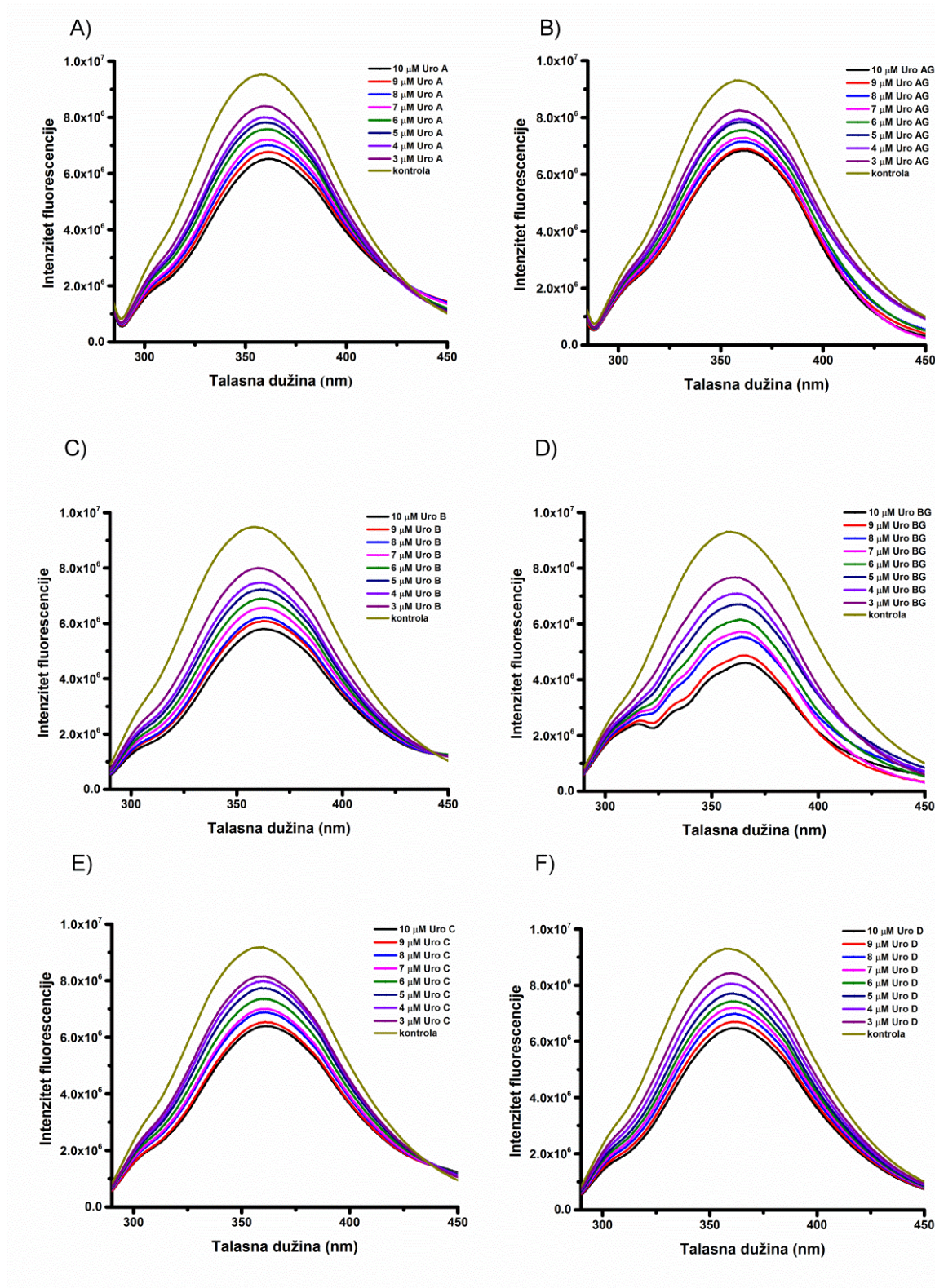
Urolitin	pH	T (K)	K_{SV} ($Lmol^{-1}$) $\times 10^4$	K_q ($Lmol^{-1}s^{-1}$) $\times 10^{12}$
URO A	7.4	298	5.924 ± 0.571^a	$11,8472 \pm 1,1412^a$
URO AG	7.4	298	4.447 ± 0.4737^b	8.8934 ± 0.9474^b
URO B	7.4	298	1.286 ± 0.3432^a	2.5728 ± 0.6864^a
URO BG	7.4	298	0.772 ± 0.237^b	1.5448 ± 0.4746^b

5.1.2. Gašenje intrinzične fluorescencije HSA

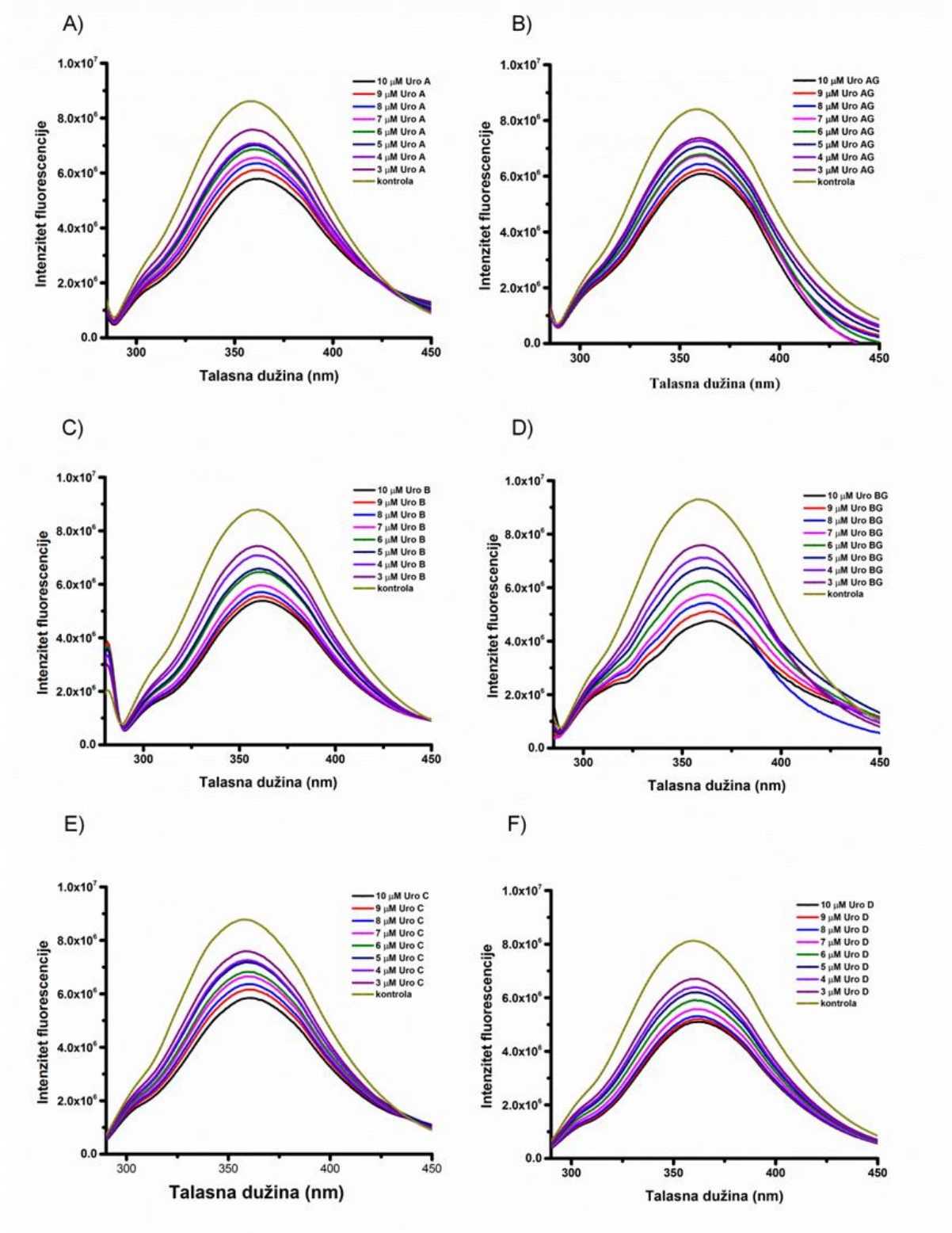
Odlika HSA je unutrašnja fluorescencija koja potiče od prisustva aromatičnih aminokiselinskih ostataka (Trp i Tyr), sa karakterističnim pikom fluorescencije na oko 360 nm [111]. Glavna intrinzična fluorofora HSA je Trp214 u subdomenu IIA. Vezivanje fenolnih jedinjenja za HSA dovodi do suptilnih strukturnih promena, što za posledicu ima menjanje mikrookruženja fluorofore proteina i gašenje njegove intrinzične fluorescencije. Ova osobina je iskorišćena za proučavanje vezivanja malih molekula i lekova za HSA [112].

Da bi se posmatralo gašenje fluorescencije HSA sa različitim URO, fluorescentni emisijski spektri su snimani sa rastućom koncentracijom URO (od 3 μM do 10 μM , sa inkrementom od 1 μM). Kada je pobuđen na talasnoj dužini (λ_{ex}) od 280 nm, emisijski spektar fluorescencije HSA pokazuje karakterističan pik na 360 nm. Intenzitet unutrašnje fluorescencije HSA opada za približno 30% nakon interakcije sa najvećom koncentracijom URO (10 μM) bez promene apsorpcionog maksimuma λ_{em} ili oblika pika. Gašenje fluorescencije HSA zavisi od koncentracije i može se primetiti značajno smanjenje intenziteta fluorescencije na λ_{em} (slika 15) na temperaturi od 298 K i pH od 7.4 u prisustvu rastućih koncentracija URO.

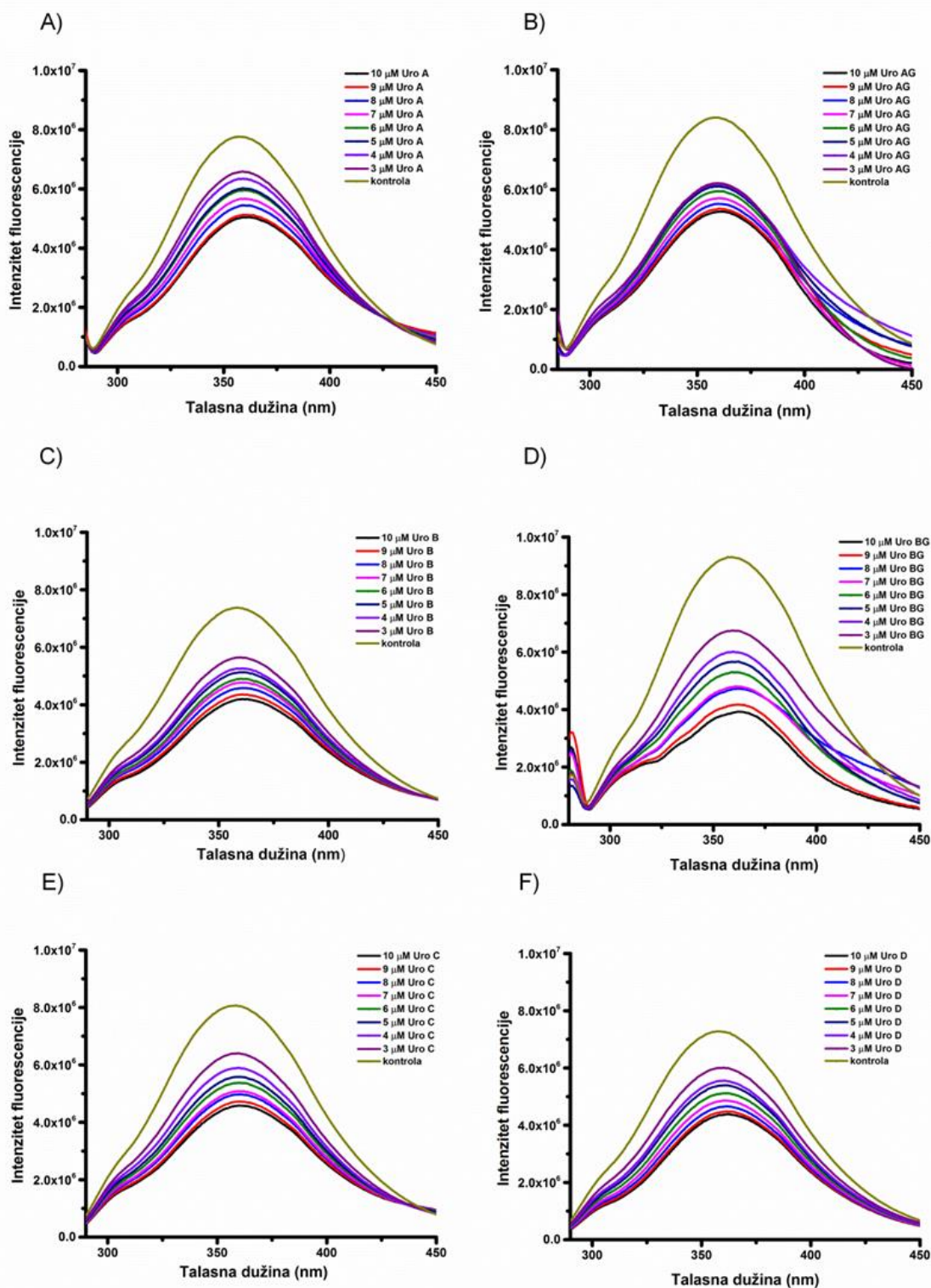
Sličan trend gašenja fluorescencije zavisno od koncentracije može se primetiti i kod druge dve ispitivane temperature (303 K i 310 K) (slike 16 i 17), bez vidljivih promena bilo u apsorpcionom maksimumu λ_{em} ili obliku pika. Nedostatak plavog ili crvenog pomaka u gašenju fluorescencije tokom interakcije između HSA i URO, sugeriše da vezivanje liganda ne menja značajno lokalno okruženje fluorofora ili strukturu proteina oko fluorofora [40].



Slika 15. Emisioni fluorescentni spektri HSA u prisustvu rastućih koncentracija urolitina **(A)** URO A **(B)** URO AG **(C)** URO B **(D)** URO BG **(E)** URO C **(F)** URO D pri ekscitaciji $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm. Uslovi: pH = 7,4, T = 298 K. Kontrola je 3 μ M HSA, dok se koncentracija URO povećava od 3 μ M do 10 μ M sa inkrementom od 1 μ M.



Slika 16. Emisioni fluorescentni spektri HSA u prisustvu rastućih koncentracija urolitina **(A)** URO A **(B)** URO AG **(C)** URO B **(D)** URO BG **(E)** URO C **(F)** URO D pri ekscitaciji $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. Uslovi: pH = 7,4, T = 303 K. Kontrola je 3 μM HSA, dok se koncentracija URO povećava od 3 μM do 10 μM sa inkrementom od 1 μM .



Slika 17. Emisioni fluorescentni spektri HSA u prisustvu rastućih koncentracija urolitina **(A)** URO A **(B)** URO AG **(C)** URO B **(D)** URO BG **(E)** URO C **(F)** URO D pri ekscitaciji $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. Uslovi: pH = 7,4, T = 310 K. Kontrola je 3 μM HSA, dok se koncentracija URO povećava od 3 μM do 10 μM sa inkrementom od 1 μM .

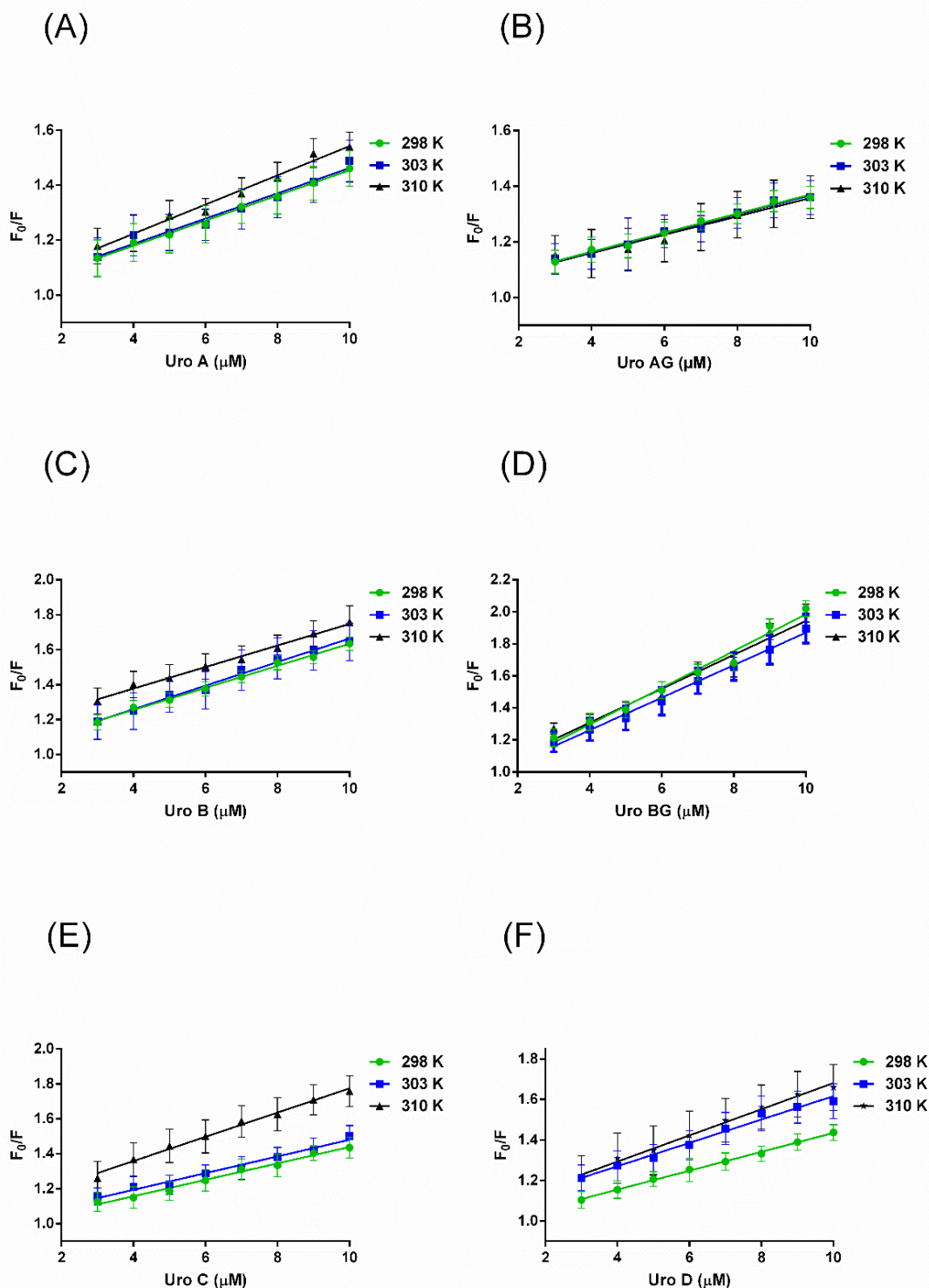
5.2. Stern-Volmerov dijagrami i konstante HSA-URO kompleksa

Gašenje fluorescencije HSA može se desiti kroz tri različita mehanizma: statički (fluorofora i kvenčer formiraju kompleks koji nije fluorescentan), dinamički (fluorofora i kvenčer se sudaraju pri prelasku u pobuđeno stanje, pri čemu ne dolazi do formiranja kompleksa fluorofora-kvenčer) i mešoviti (kombinacija statičkog i dinamičkog gašenja) [38]. Stern-Volmerovi dijagrami su konstruisani prema jednačini 3 iz poglavlja 4.2.2. Relativan intenzitet fluorescencije (F_0/F) kao funkcija koncentracije kvenčera $[Q]$ na 298 K, 303 K i 310 K pokazuje linearnost za korišćeni opseg koncentracija, što ukazuje na statički mehanizam gašenja (slika 18). Međutim, postoji izražena promena nagiba prave sa porastom temperature, što sugerise „model sfere delovanja“ odnosno kombinaciju statičkog i dinamičkog procesa gašenja HSA. Prema ovom modelu, postoji zapremina sfere koja okružuje fluoroforu, unutar koje kvenčer gasi fluorescenciju sa verovatnoćom od jedan. Kada je kvenčer u neposrednoj blizini proteina tokom procesa njegove ekscitacije dolazi do gašenja fluorescencije. U ovom modelu se ne formira osnovno stanje kompleksa protein-kvenčer. Pošto su prisutni i statički i dinamički mehanizmi gašenja fluorescencije, podaci su analizirani korišćenjem modifikovane verzije Stern-Volmerovog dijagrama prema jednačini 4 iz poglavlja 4.2.2. Vrednosti K_{sv} su određene iz nagiba linearne veze između $\ln(F_0/F)$ i $[Q]$ (slika 19). Štaviše, dobijene vrednosti za bimolekularne konstante gašenja (k_q) (Tabela 6) daleko prevazilaze gornju granicu za mehanizam dinamičkog gašenja od $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ na sve tri temperature (298 K, 303 K i 310 K), što dodatno potvrđuje model sfere delovanja [113].

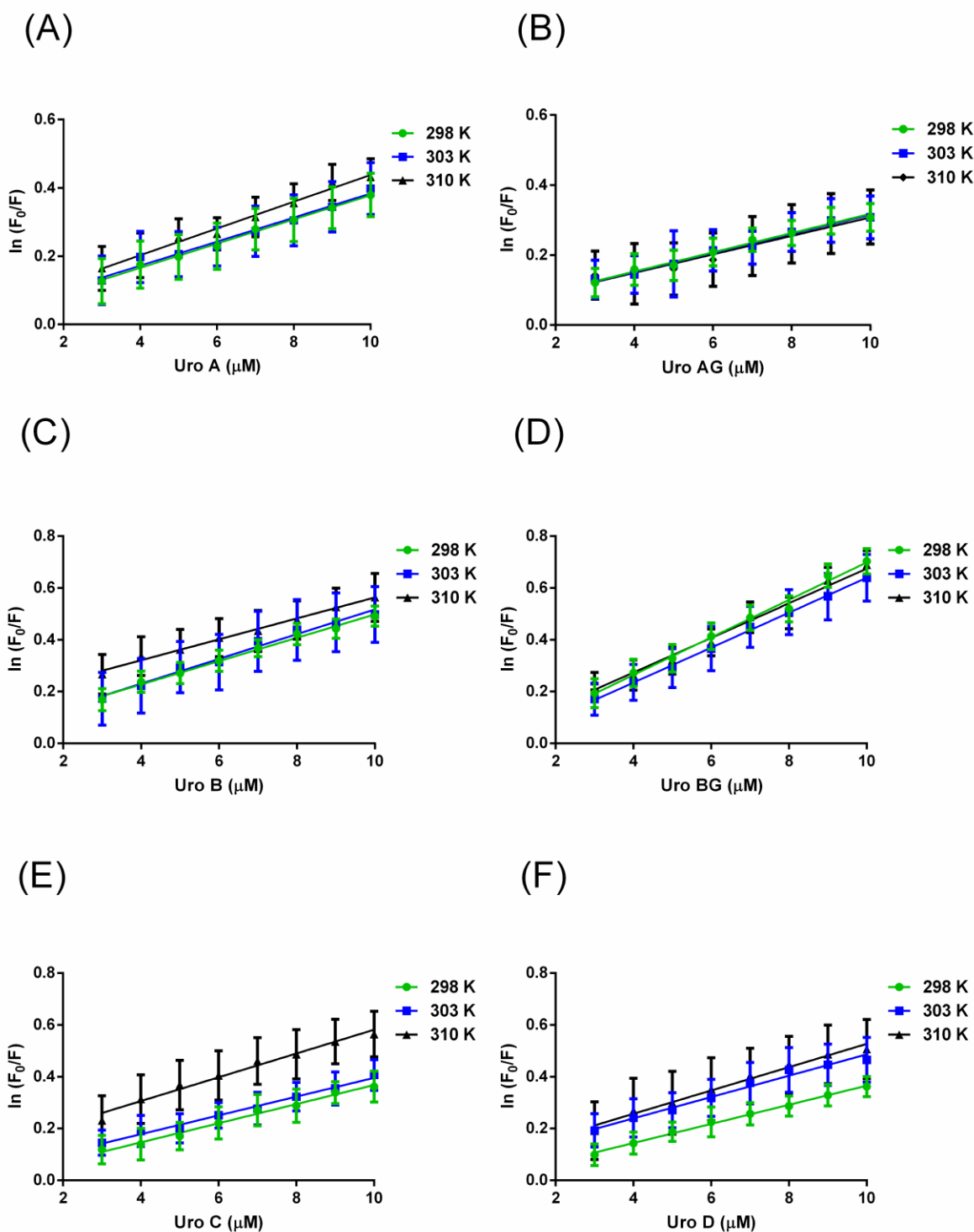
Tabela 6. Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), bimolekularne konstante gašenja (k_q) i parametri vezivanja različitih URO za HSA na 298 K, 303 K i 310 K i pH 7,4.

Urolitin	pH	T (K)	K_{sv} (Lmol^{-1}) $\times 10^4$	k_q ($\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$) $\times 10^{12}$	$^aR^2$	S.D.	K_b (Lmol^{-1}) $\times 10^4$	n	$^bR^2$
URO A	7.4	298	3.52	3.52	0.9959	0.0928	3.71	0.975	0.9927
		303	3.54	3.54	0.9767	0.2214	2.1	0.925	0.9608
		310	3.92	3.92	0.9878	0.1778	1.7	0.893	0.9817
URO AG	7.4	298	2.75	2.75	0.9883	0.1222	0.68	0.848	0.98
		303	2.73	2.73	0.9835	0.1442	0.64	0.842	0.9714
		310	2.64	2.64	0.9696	0.1997	0.22	0.758	0.9119
URO B	7.4	298	4.5	4.5	0.9922	0.163	4.59	0.961	0.993
		303	4.78	4.78	0.983	0.2564	1.05	1.026	0.9892
		310	4.83	4.83	0.9913	0.1543	0.13	0.774	0.9848
URO BG	7.4	298	7.24	7.24	0.9942	0.2708	222.84	1.253	0.9952
		303	6.74	6.74	0.9985	0.1181	183.23	1.286	0.9972
		310	6.67	6.67	0.9791	0.3103	22.49	1.064	0.952
URO C	7.4	298	3.62	3.62	0.9896	0.1547	12.85	1.085	0.9819
		303	3.69	3.69	0.9886	0.1514	1.76	0.907	0.9784
		310	4.59	4.59	0.9798	0.2692	0.81	0.794	0.988
URO D	7.4	298	3.69	3.69	0.9967	0.092	30.9	1.158	0.9947
		303	4.11	4.11	0.9827	0.2231	2.06	0.886	0.9892
		310	4.5	4.5	0.9854	0.2236	1.13	0.884	0.9876

^aR je koeficijent korelacije za K_{sv} vrednosti. S.D. je standardna greška za K_{sv} , i ^bR je koeficijent korelacije za K_b vrednosti.



Slika 18. Stern-Volmerovi dijagrami za analizu gašenja HSA fluorescencije različitim URO **A)** URO A **B)** URO AG **C)** URO B **D)** URO BG **E)** URO C **F)** URO D, na temperaturi od 298 K (zelena), 303 K (plava) i 310 K (crna) i pH vrednosti od 7,4. Koncentracija HSA je $3 \mu\text{M}$, dok je koncentracija URO povećana sa $3 \mu\text{M}$ na $10 \mu\text{M}$ sa inkrementom od $1 \mu\text{M}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardne greške trostrukih merenja.

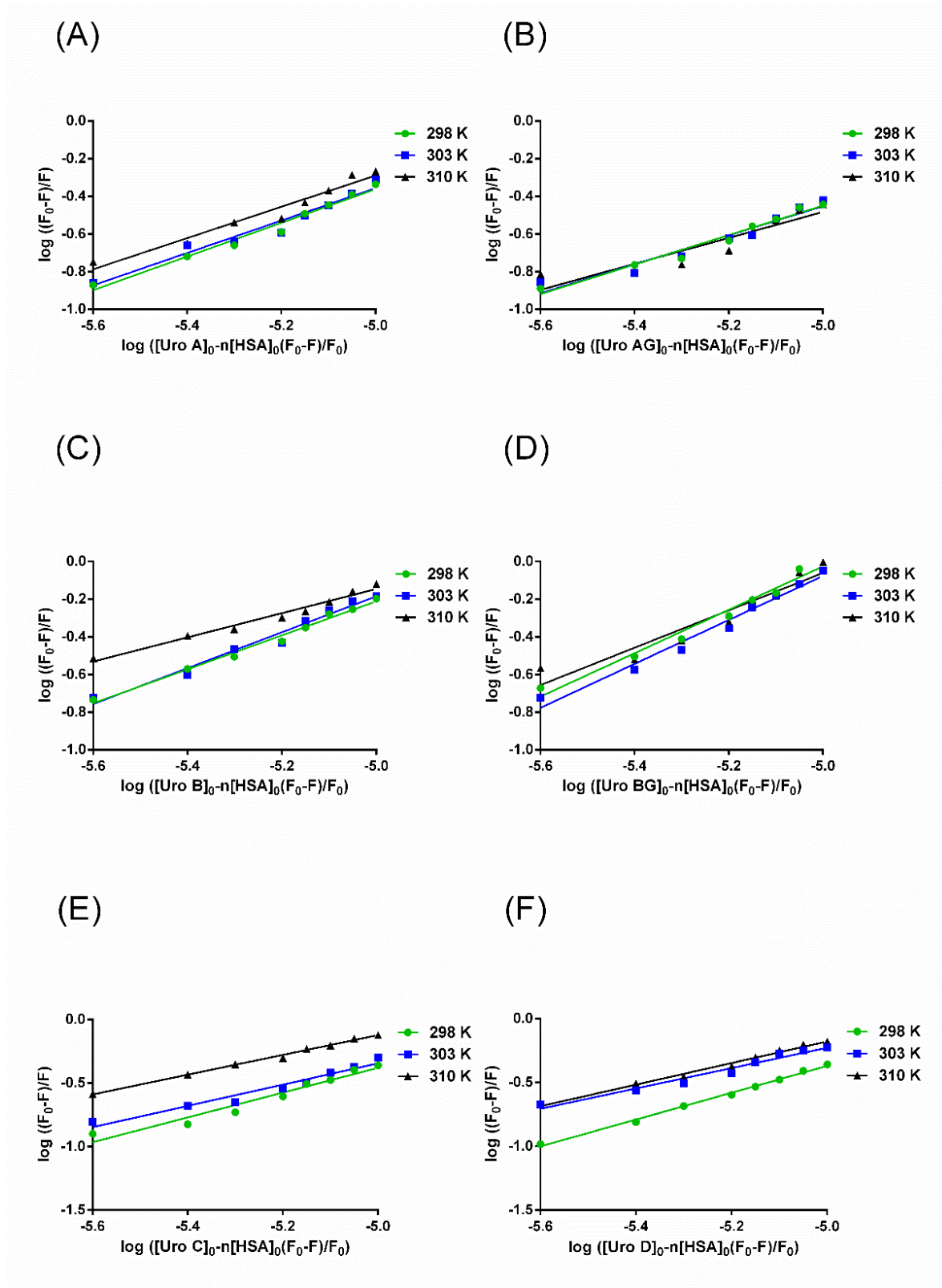


Slika 19. Modifikovan Stern-Volmerovi dijagrami za analizu gašenja HSA fluorescencije od strane različitih URO (A) URO A (B) URO AG (C) URO B (D) URO BG (E) URO C (F) URO D, na temperaturi od 298 K (zelena), 303 K (plava) i 310 K (crna) i pH vrednosti od 7,4. Koncentracija HSA je 3 μM , dok je koncentracija URO povećana sa 3 μM na 10 μM sa inkrementom od 1 μM . Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardne greške trostrukih merenja.

5.3. Konstante vezivanja i broj vezivnih mesta u HSA

Dvostruko-logaritamski dijagrami interakcije URO sa HSA na tri različite temperature dali su informacije o konstantama vezivanja (K_b) i broju vezivnih mesta (n) na HSA molekulu. Izračunata vrednost n za sve URO je približno 1 što ukazuje na prisustvo samo jednog vezivnog mesta na proteinu.

Vrednosti K_b za URO-HSA komplekse su u opsegu od 10^4 - 10^5 L mol⁻¹. Konstanta vezivanja ovog reda veličine označavaju da URO imaju umereni afinitet vezivanja za HSA (**slika 20**). Pored toga, K_b opada sa povećanjem temperature. Dobijene vrednosti (prikazane u **tabeli 6**) ukazuju da se vezivanje URO za HSA bolje izvodi na nižoj temperaturi.



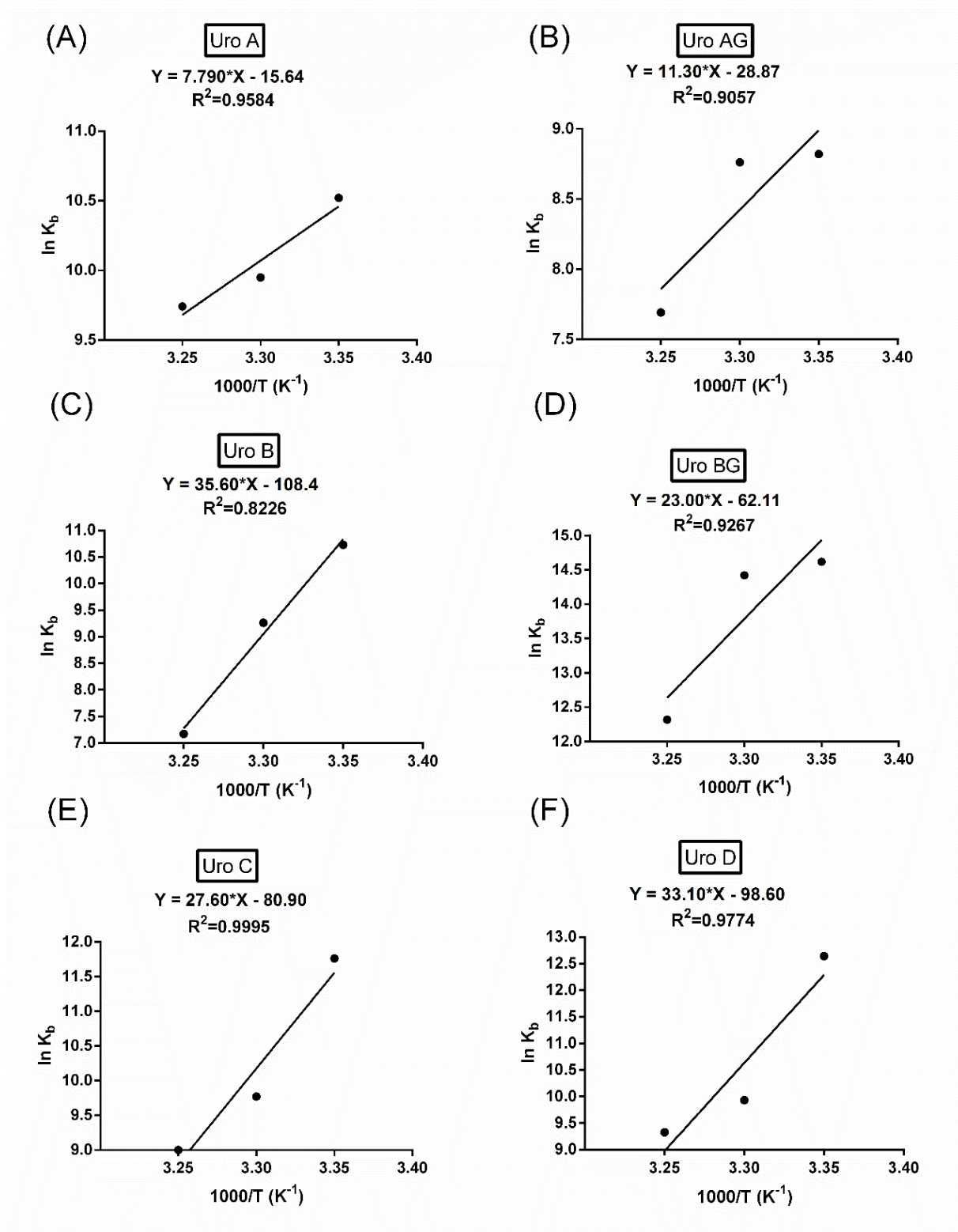
Slika 20. Dvostruki logaritamski dijagrami za određivanje konstanti vezivanja (K_b) i broja vezivnih mesta (n) za **(A)** URO A **(B)** URO AG **(C)** URO B **(D)** URO BG **(E)** URO C **(F)** URO D na HSA (3 μ M) na tri različite temperature (298 K, 303 K i 310 K) i pH 7,4.

5.4. Termodinamički parametri HSA-URO kompleksa

Nekovalentne interakcije definišu jačinu vezivanja između proteina i liganda. Nekovalentne interakcije koje se formiraju u vezivnom mestu proteina pri vezivanju liganda uključuju vodonične veze, sone mostove, hidrofobne i van der Waalsove interakcije, π - π interakcije i sterne kontakte, a sve one zajedno određuju koliko snažno će se ligand vezati. Analiza termodinamičkih parametara, uključujući promenu entalpije (ΔH), promenu entropije (ΔS) i promenu slobodne energije (ΔG), je važna za proučavanje interakcija između HSA i URO [114].

Kako bi se termodinamički parametri (ΔH i ΔS) izračunali neophodno je bilo da se prati temperaturna zavisnost konstante vezivanja URO za HSA na tri različite temperature (298 K, 303 K i 310 K). Ovi parametri se tada određuju iz van't Hoffove jednačine (8) date u poglavlju 4.2.3, tj. iz grafika zavisnosti $\ln K_b$ od $1/T$. Parametar ΔH se računa iz nagiba prave, dok se parametar ΔS dobija iz preseka sa y-osom van't Hoffovog dijagrama (slika 21). Izračunati parametri su prikazani u tabeli 7. Promena Gibsove slobodne energije (ΔG) prilikom vezivanja svakog URO na tri različite temperature može se izračunati iz jednačine (9) date u poglavlju 4.2.3. Dobijene vrednosti za ΔG (tabela 7) su negativne, što ukazuje da je reakcija formiranja HSA-URO kompleksa egzergona i spontana.

Sa termodinamičkog aspekta, negativne vrednosti ΔH i ΔS ($\Delta H < 0$ i $\Delta S < 0$) ukazuju da su van der Waalsove interakcije ili vodonične veze, dominantan faktor u formiranju kompleksa HSA-URO [115]. Vrednosti K_b za sve URO pokazuju opadanje sa porastom temperature, što zajedno sa negativnim ΔH sugeriše da smanjenje entropije ima ključnu ulogu. Proces vezivanja postaje manje povoljan na višim temperaturama zbog povećanja $-T\Delta S$, koje prevazilazi doprinos egzotermne prirode procesa. Kao rezultat toga, interakcija između URO i HSA je primarno vođena entalpijskim faktorima, dok smanjenje entropije otežava vezivanja na višim temperaturama, što se jasno vidi iz promene ΔG [116].



Slika 21. Van't Hoffov dijagram za interakciju HSA sa (A) URO A (B) URO AG (C) URO B (D) URO BG (E) URO C (F) URO D.

Tabela 7. Termodinamički parametri kompleksa HSA-URO na tri različite temperature (298 K, 303 K i 310 K) i pH 7,4.

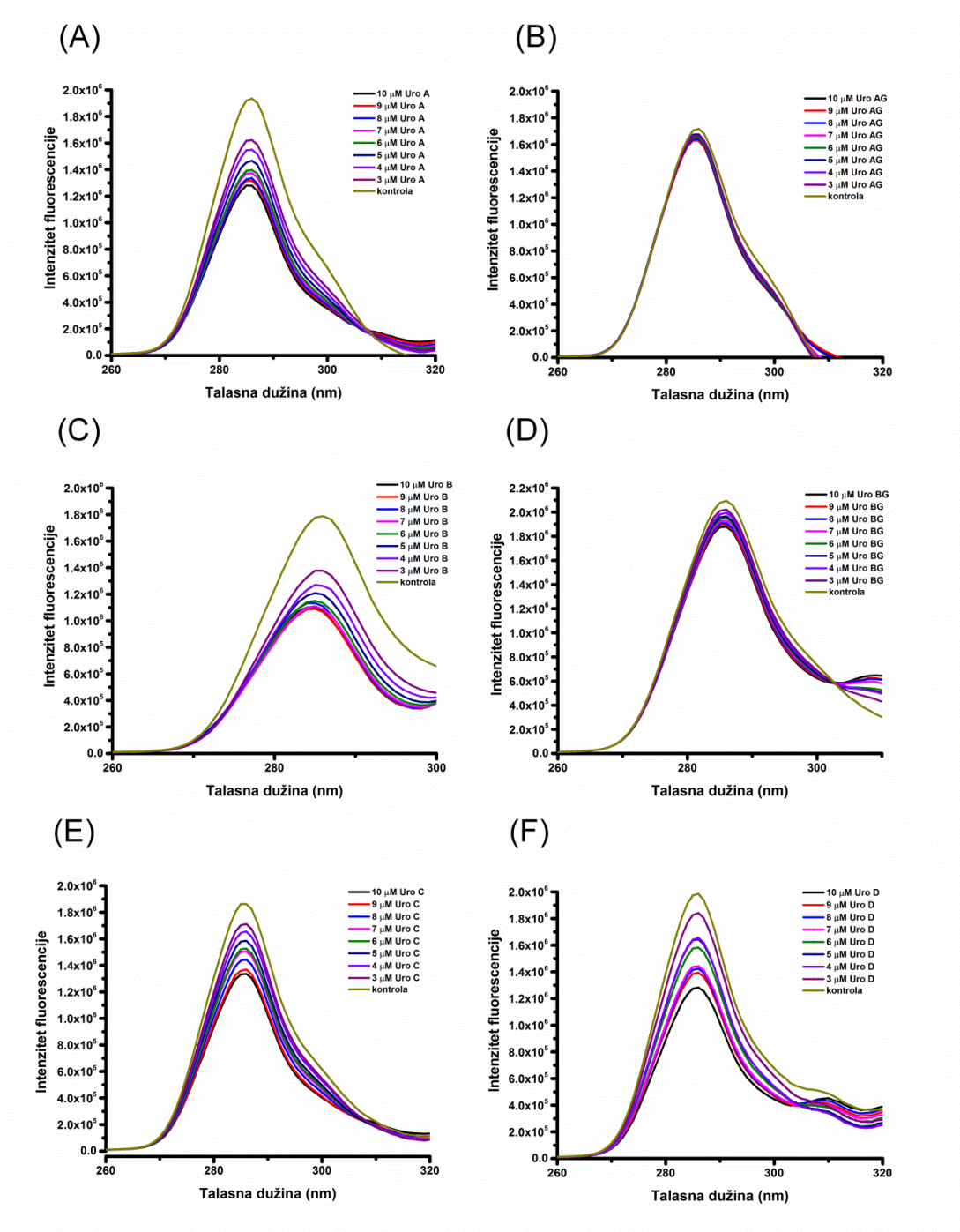
Urolitin	pH	T (K)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	R ²
URO A	7.4	298	-64.77	-130.03	-26.03	0.9584
		303			-25.38	
		310			-24.47	
URO AG	7.4	298	-93.95	-240.02	-22.42	0.9057
		303			-21.22	
		310			-19.54	
URO B	7.4	298	-295.98	-901.24	-27.41	0.8226
		303			-22.98	
		310			-16.59	
URO BG	7.4	298	-191.22	-516.38	-37.34	0.9267
		303			-34.76	
		310			-31.14	
URO C	7.4	298	-229.47	-672.6	-29.03	0.9995
		303			-25.67	
		310			-20.96	
URO D	7.4	298	-275.19	-819.76	-30.9	0.9774
		303			-26.8	
		310			-21.06	

5.5. Sinhroni fluorescentni spektri HSA-URO kompleksa

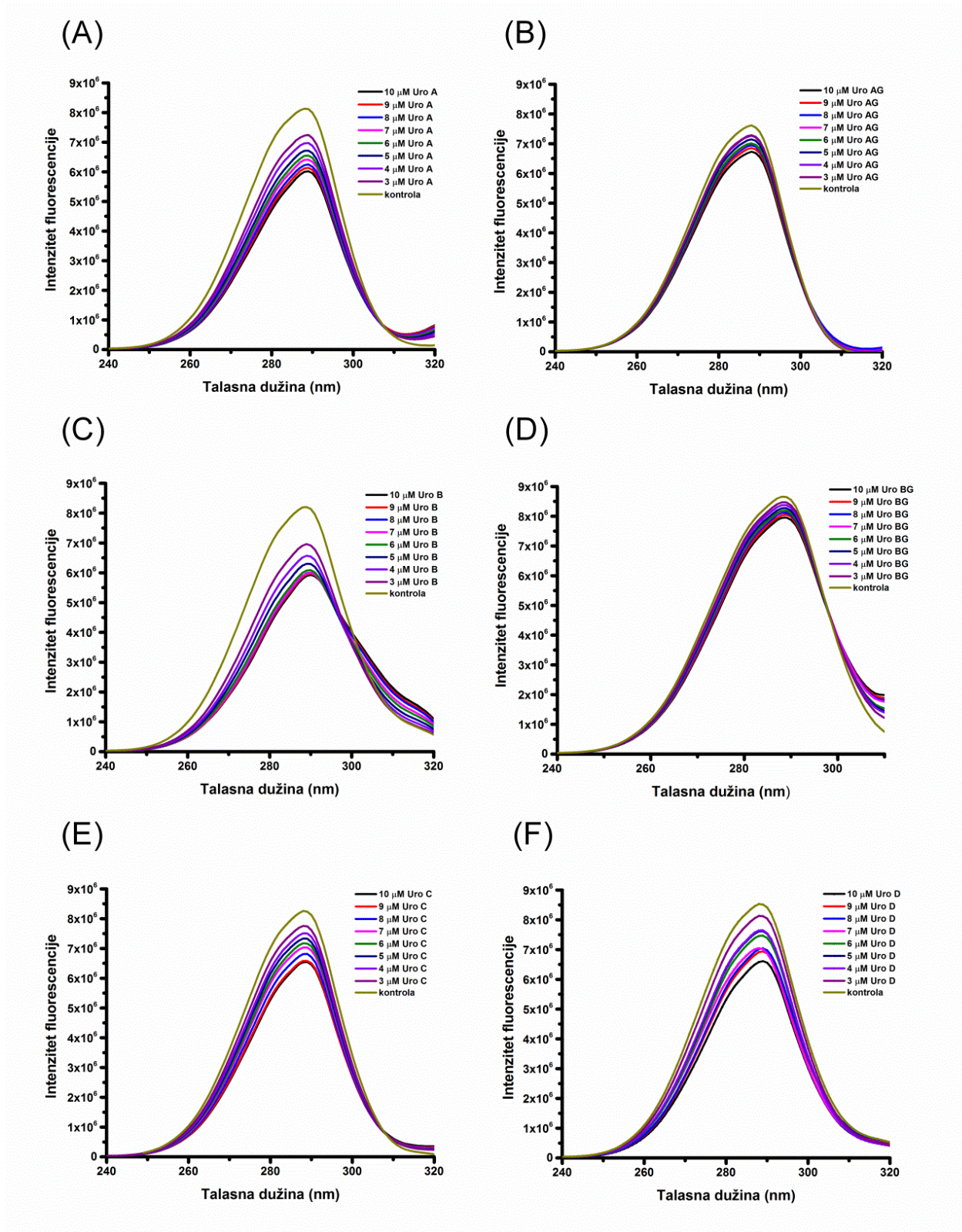
Sinhrona fluorescentna spektroskopija je tehnika koja se koristi za analizu promena u mikrookruženju aromatičnih aminokiselinskih ostataka Tyr i Trp u HSA molekulu pri interakcijama sa URO [117]. Tokom eksperimenta, emisioni i ekscitacioni monohromatori su radili sinhronizovano, pri čemu su održavali konstantnu razliku talasnih dužina između ekscitacije (λ_{ex}) i emisije (λ_{em}), označenu kao $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). Ovo znači da se, za svaku promenjenu vrednost λ_{ex} , odgovarajuća λ_{em} pomerala za isti interval, omogućavajući analizu sinhronne fluorescencije. Utvrđeno je da Tyr ostaci imaju karakterističan spektar na $\Delta\lambda = 15$ nm, dok Trp ostaci imaju karakterističan spektar na $\Delta\lambda = 60$ nm [118]. Ova dva aminokiselinska ostatka, Tyr i Trp, pokazuju fluorescentne emisije pikove na koje utiče polarnost njihovog okruženja. Uticaj dodavanja različitih URO na spektre sinhronne fluorescencije HSA na $\Delta\lambda = 15$ i $\Delta\lambda = 60$ nm prikazan je na **slikama 22 i 23**.

Sinhrona fluorescencija je osetljiva na promene mikrookruženja aminokiselinskih ostataka u proteinu. Dobijeni rezultati pokazali su prisustvo jednog mesta vezivanja na HSA molekulu za urolitine. URO istovremeno gasi fluorescenciju oba aminokiselinska ostatka (Tyr i Trp). Sa povećanjem koncentracije URO dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije na oba ostatka. Ovi podaci pokazuju da oba aminokiselinska ostatka učestvuju u vezivanju URO. Na osnovu ovoga može se zaključiti da je Sudlow mesto I primarno mesto za vezivanje aglikona (**slike 22 i 23 pod A), C), E), i F)**). Smanjenje intenziteta fluorescencije oba aminokiselinska ostatka pri vezivanju URO C i URO D (**slike 22 i 23 pod E) i F)**) je manje izraženo, što ukazuje na slabiju interakciju sa HSA na Sudlow I mestu u poređenju sa URO A i URO B. URO C i URO D su veće i složenije strukture zbog prisustva hidroksilinih grupa, što utiče na njihovo vezivanje za Sudlow I mesto na HSA. Prisutne -OH grupe

smanjujuu afinitet vezivanja jer uvode sterne smetnje, ometaju elektrostatičke interakcije i izazivaju nepovoljne konformacione promene prilikom vezivanja za Sudlow I mesto. Za URO AG i URO BG maksimumi talasnih dužina emisije Tyr i Trp ostataka nisu se značajno promenile. Ovakvi rezultati ukazuju da se konjugovani URO vezuju preferencijalno za druga mesta na HSA molekulu, a ne za Sudlow I mesto (slika 22 B) i D) i slika 23 B) i D)).



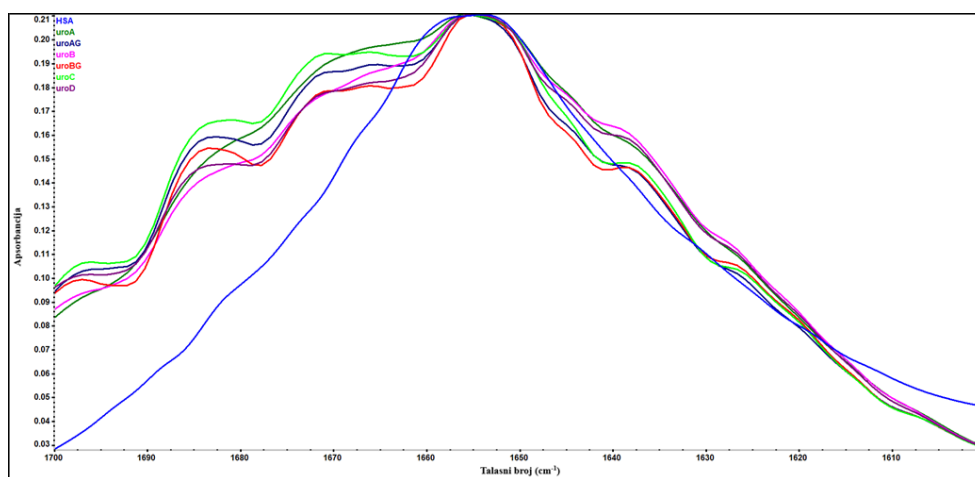
Slika 22. Uticaj dodavanja različitih URO (od 3 μM do 10 μM) na sinhronu fluorescentne spektre HSA (3 μM) na $\Delta\lambda = 15$ nm: **A)** URO A; **B)** URO AG; **C)** URO B; **D)** URO BG; **E)** URO C; **F)** URO D na 298 K i pH 7,4.



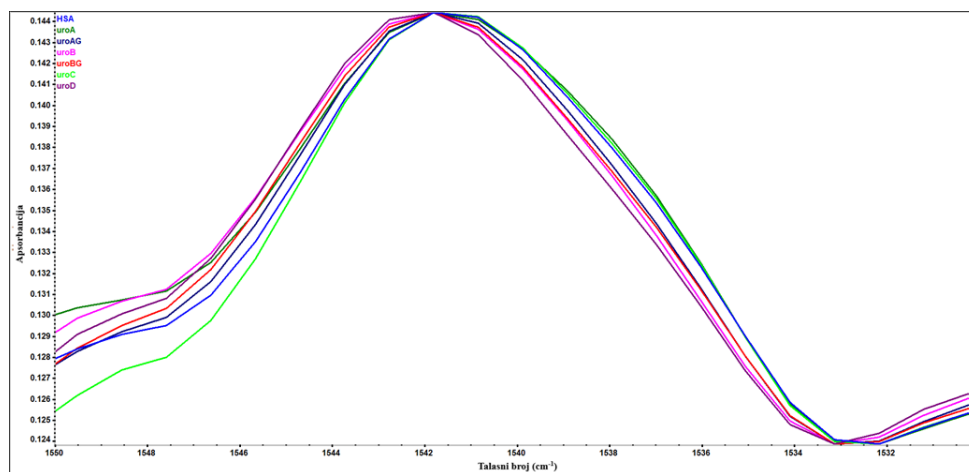
Slika 23. Uticaj dodavanja različitih URO (od 3 μM do 10 μM) na sinhronu fluorescentne spektre HSA (3 μM) na $\Delta\lambda = 60$ nm: **A)** URO A; **B)** URO AG; **C)** URO B; **D)** URO BG; **E)** URO C; **F)** URO D na 298 K i pH 7,4.

5.6. FT-IR spektri HSA-URO kompleksa

Strukturne promene koje je molekul HSA pretrpeo kada je stupio u interakciju sa URO su potvrđene podacima dobijenim FT-IR spektroskopijom. Konformacija proteinske peptidne veze može se analizirati unutar pikova amida I, II i III. Utvrđeno je da se infracrveni spektri proteina nalaze na lokaciji pika amida I ($\approx 1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) i proizlaze iz C=O rastezanja, dok se amidna II traka nalazi na $\approx 1548\text{ cm}^{-1}$ i izvedena je iz NH savijanja u ravni i CN istezanja [49, 50]. Amidni I pik HSA pokazuje karakterističan maksimum na 1650 cm^{-1} koji se pripisuje najistaknutijoj sekundarnoj strukturi proteina - α -heliksu [119]. Na signal u amidnom I regionu koji potiče od valencionih C=O vibracija peptidnih veza može uticati prisustvo karboksilne grupe URO. Interferencija C=O grupa URO se može primetiti posebno na talasnim dužinama od $1660\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, što čini amidni I region nepogodnim za dalju strukturnu analizu (slika 24). Amidni II region je konformaciono daleko manje osetljiv (slika 25), što je u skladu sa prethodno objavljenim podacima [119].

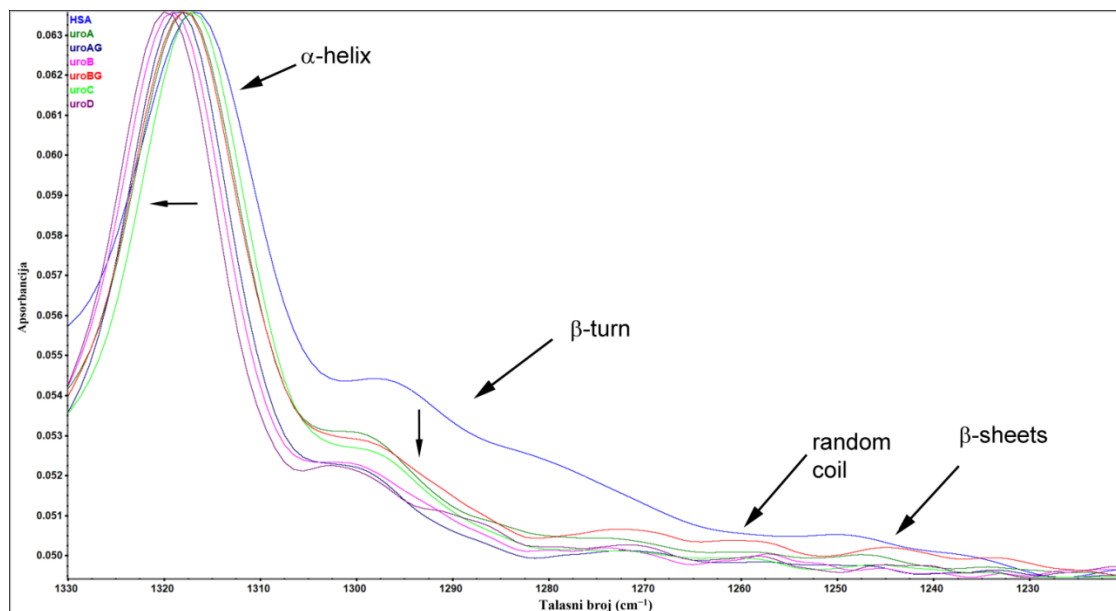


Slika 24. Amidni I region FT-IR spektra HSA u odsustvu i prisustvu različitih URO (pri pH 7,4)



Slika 25. Amidni II region FT-IR spektra HSA u odsustvu i prisustvu različitih URO (pri pH 7,4)

Za posmatranje promena u sekundarnoj strukturi HSA nakon vezivanja različitih URO koristi se amidni III region (u kojem NH savijanje i CN vibracije istezanja doprinose na konformaciono zavisani način). Trake unutar amidnog III region označavaju određene sekundarne strukture kao što su: 1330-1295 cm^{-1} , α -heliks; 1295-1270 cm^{-1} , β -zavijutak; 1270-1250 cm^{-1} , nasumične petlje; 1250-1220 cm^{-1} , β pločice [120]. **Slika 26** prikazuje amidni III region FT-IR spektra HSA i HSA-URO uzoraka. Spektri unutar amidnog III regiona pokazuju očuvanje najdominantnije sekundarne strukture, α -heliksa, što ukazuje da primenjene koncentracije URO nisu izazvale značajno narušavanje native strukture HSA. Međutim, najistaknutije promene nakon vezivanja URO su blago crveno pomeranje vrha dodeljenog α -heliksu i smanjeni intenzitet pika β -kalema, što ukazuje na prevashodno vezivanje URO unutar proteinskih regiona koji sadrže ove dve strukture (**Slika 26**).

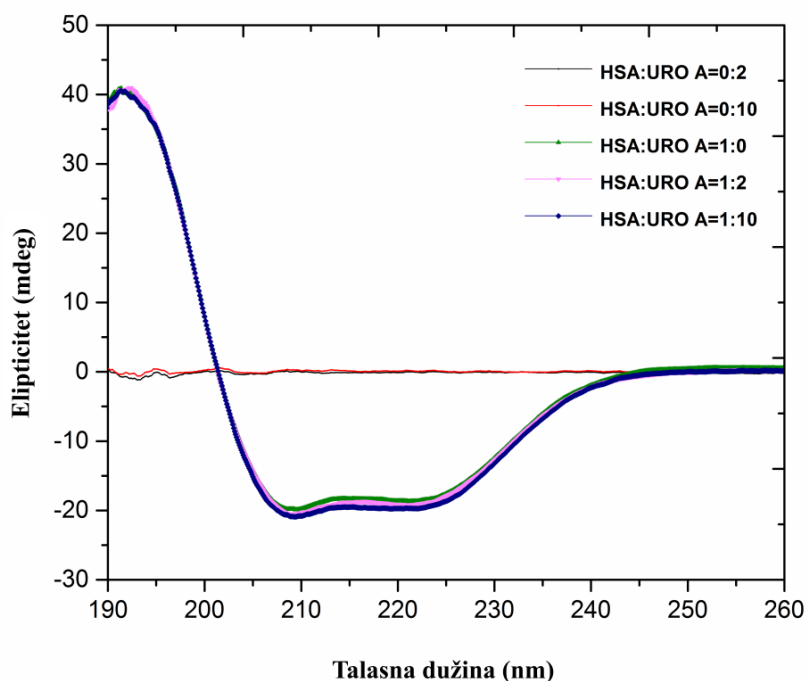


Slika 26. Amidni III region FT-IR spektra HSA u odsustvu i prisustvu različitih URO (pri pH 7,4)

5.7. CD spektri kompleksa HSA-URO A

CD spektroskopija je jednostavna, brza i nedestruktivna tehnika koja pruža strukturne informacije vezane za asimetriju molekula. Cirkularni dihiroizam peptidnih veza važan je za određivanje sekundarnih struktura proteina jer će različite sekundarne strukture imati različite intenzitete, položaje pikova i oblike traka u CD spektru. Praćenjem promena sekundarnih struktura može se istražiti uticaj vezivanja liganda na konformaciju proteina [48, 121].

CD spektri slobodnog HSA molekula pokazuju dve karakteristične negativne trake na 208 nm i 222 nm u dalekom UV regionu (**slika 27**), što dominantno potiče od α -helikoidne strukture proteina [122]. Dodavanje URO A proteinu u molarnom odnosu 2:1 i 10:1 ne dovodi do povećanja negativne eliptičnosti, pomeranja pikova ili promene oblika spektra proteina (**slika 27**). CD spektar URO A je sniman u ovom regionu i ne pokazuje optičku aktivnost (**slika 27**). Na dobijenim spektrima se ne pokazuju nikakve promene, što ukazuje da vezivanje URO A za HSA nije izazvalo bilo kakvu uočljivu promenu u sekundarnim strukturama HSA, niti je dovelo do destabilizacije proteina i/ili gubitka specifičnog helikoidnog aranžmana.



Slika 27. Daleki UV CD spektri slobodnog URO A (6 μ M; crna linija i 30 μ M; crvena linija), slobodnog HSA (3 μ M zelena linija) i HSA-URO A kompleks (molarni odnos 1:2; roze linija i 1:10; plava linija) dobijena na 298 K i pH 7,4

Kada se primene formule **10** i **11** iz poglavlja **4.2.6**, može se izračunati vrednost % α -heliksne strukture u HSA u odsustvu i prisustvu URO A. Dobijeni rezultati su prikazani u **tabeli 8**.

Tabela 8. Udeo α -heliksne strukture u HSA molekulu u odsustvu i prisustvu URO A

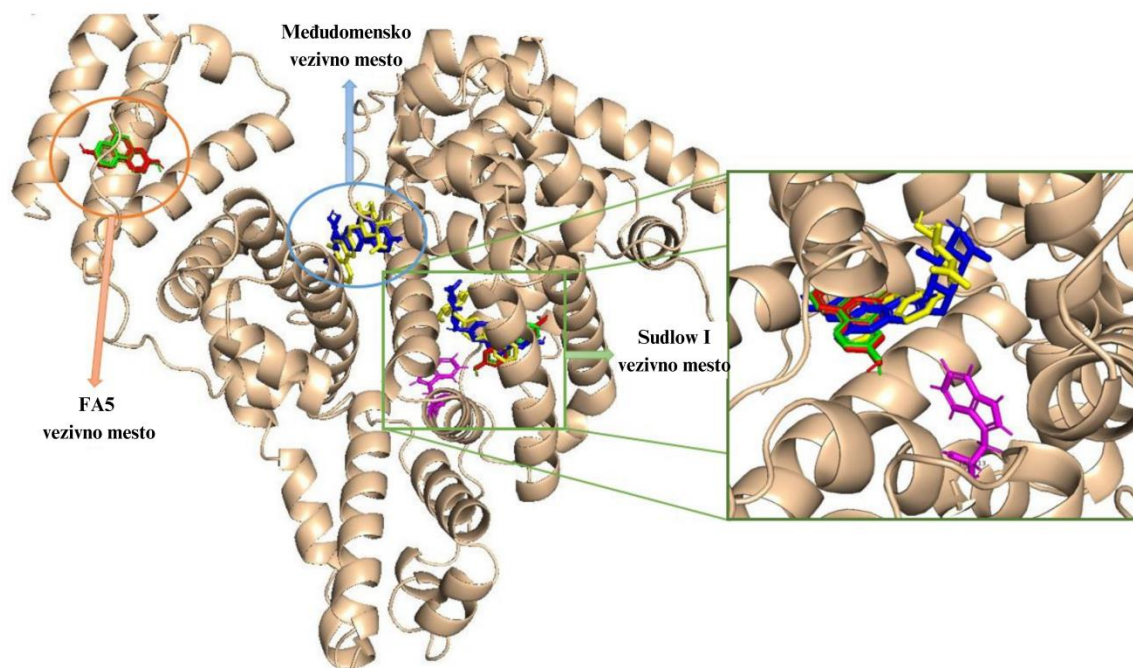
HSA:URO A	% α -heliks
1:0	66.0 %
1:2	64.7%
1:10	63.0 %

Rezultati ukazuju da vezivanje URO A za HSA ne narušava sekundarnu strukturu HSA i da je ona ostala predominantno α -heliksna, što je u skladu i sa dobijenim spektrima.

5.8. Molekulski doking serum albumina i urolitina

5.8.1 Molekulski doking BSA-URO kompleksa

Kao dopuna spektroskopskih merenja, urađen je molekulski doking BSA-URO sistema kako bi se pronašla vezivna mesta za URO na BSA. Analiza rezultata molekulskog dokinga pokazuje da je vezivno mesto sa najvećom energijom za sve ispitane URO Sudlow I mesto (**slika 28**).

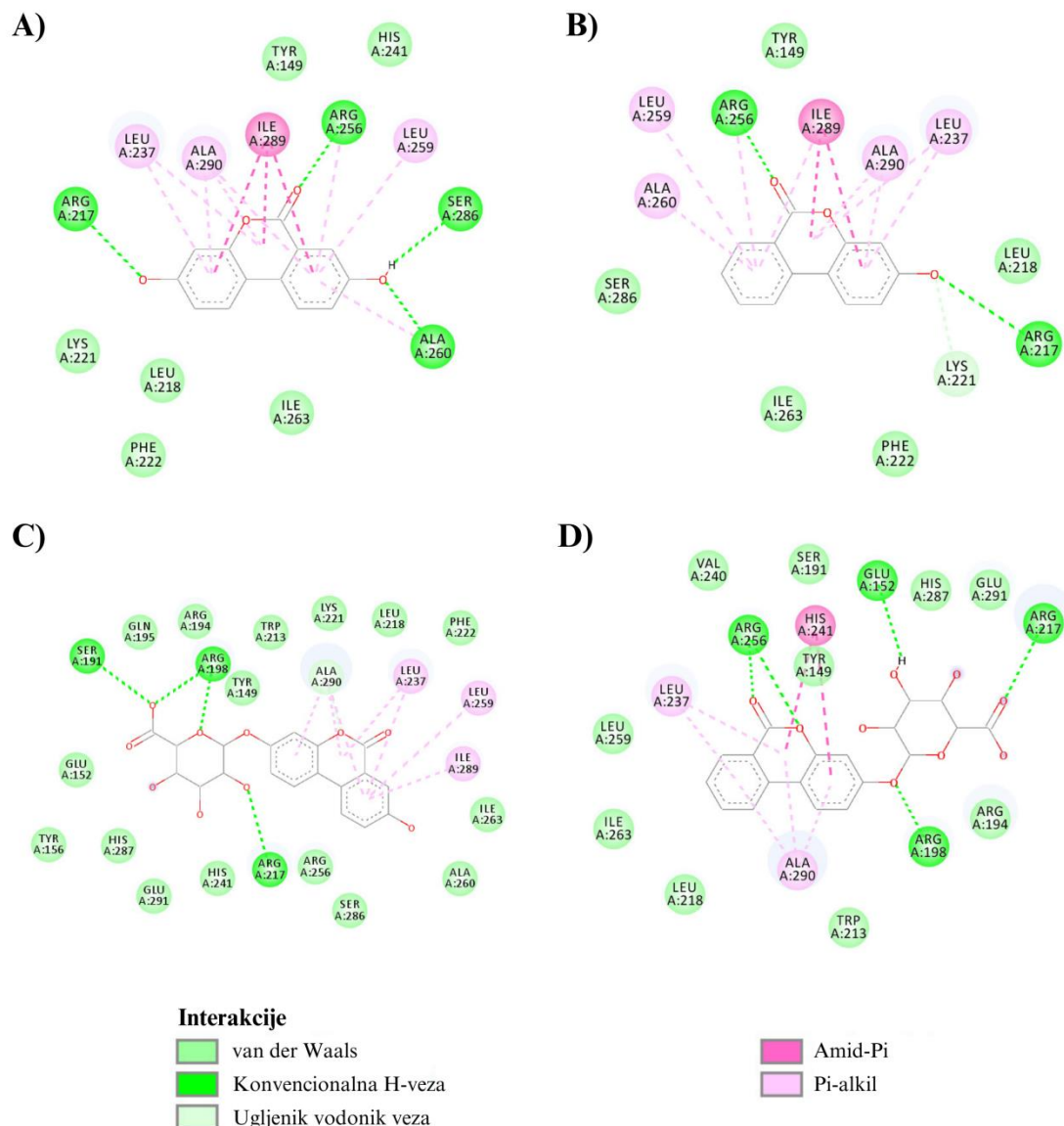


Slika 28. Molekulski doking BSA-URO sistema. Vezivna mesta visokog afiniteta za URO ligande na BSA molekulu. Ligandi i Trp 213 su prikazani kao štapičasti modeli u sledećim bojama: URO A-crvena; URO B-zeleno; URO AG-plava; URO BG-žuta; Trp 213-roze [123].

Vezivanje nekonjugovanih URO (URO A i URO B), sa sličnom energijom vezivanja (**tabela 9**) je pretežno vođeno formiranjem vodonične veze (sa Arg 217 i Arg 256) i amid- π interakcija sa amidnom grupom iz glavnog lanca aminokiselinskog ostatka Ile 289. Vezivanje je dalje stabilizovano formiranjem višestruke π -alkil i van der Waalsove interakcije (**Slika 29 A**) i **B**). Zbog dodatne hidroksilne grupe na poziciji 8, URO A formira 2 dodatne vodonične veze sa Ser 286 i Ala 260.

Vezivanje konjugovanih URO za Sudlow I vezivno mesto je nešto drugačije od vezivanja nekonjugovanih. Aglikon iz URO AG formira pretežno nepolarne interakcije sa amino kiselinama iz BSA molekula (π -alkil i van der Waalsove interakcije) dok šećerna komponenta formira 4 jake vodonične veze sa ostacima Ser 191, Arg 198 i Arg 217. Sa druge strane, aglikonski deo URO BG formira račvastu vodoničnu vezu sa Arg 256 i π - π interakciju T oblika sa imidazolom iz His 241. Međutim, vezivanje šećerne komponente URO BG omogućeno je formiranjem samo 3 vodonične veze sa Glu 152, Arg 198 i Arg 217. Veći ukupan broj vodoničnih veza i dodatnih π - π T-oblika interakcija čini vezivanje URO BG za 0,3 kcal jačim od vezivanja URO AG (**tabela 9**).

Aminokiselinski ostatak Trp 213 je zakopan u hidrofobnom džepu BSA u neposrednoj blizini mesta vezivanja Sudlow I. Rezultati doking studije su pokazali da je rastojanje između usidrenih URO i konjugovanih URO i Trp 213 između 3,2 i 5,1 Å (**slika 29 C**) i **D**) što objašnjava gašenje fluorescencije nakon vezivanja liganda. Međutim, mesto vezivanja Sudlow I je veliko, raznovrsno i visoko uređeno, tako da vezivanje liganada neće izazvati značajnu konformacionu promenu u strukturi BSA. Zato i nisu primećena pomeranja maksimuma emisije fluorescencije u spektrima [124].



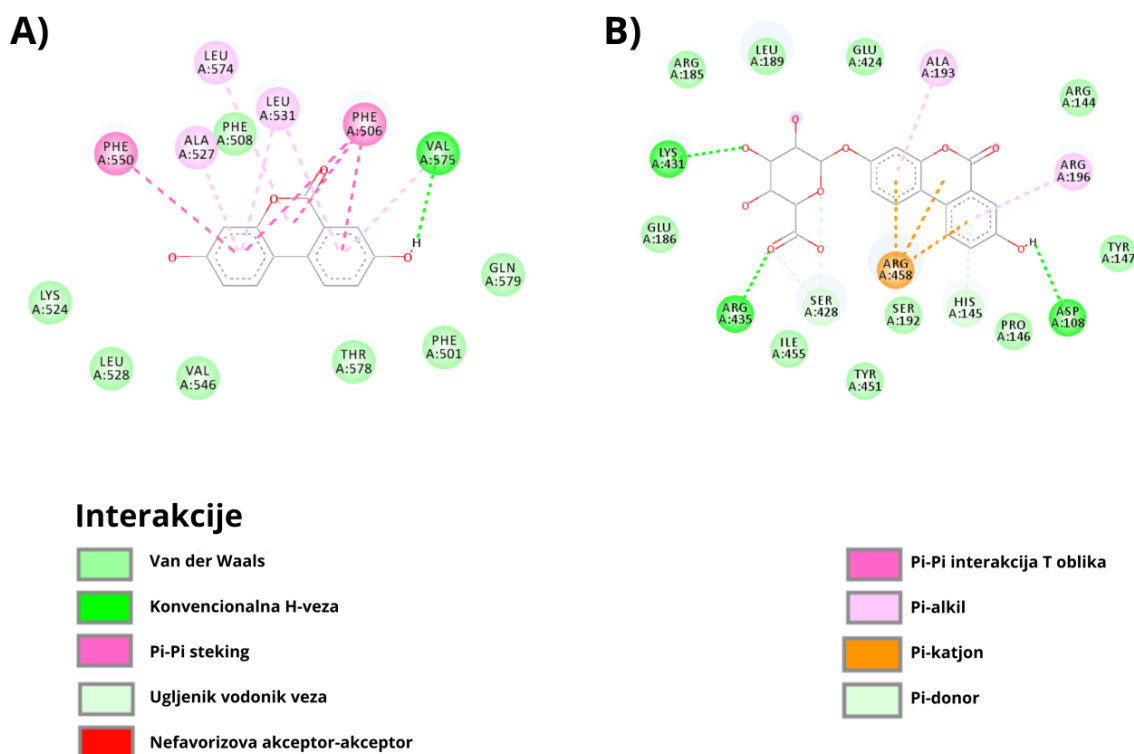
Slika 29. 2D dijagrami interakcija protein-ligand za vezivno mesto sa najvišom energijom (Sudlow I) za **A)** URO A, **B)** URO B, **C)** URO AG, **D)** URO BG (brojevi ostataka odgovaraju brojevima ostataka u PDB strukturi 4F5S; internet stranica: <https://www.rcsb.org/structure/4F5S>).

Svi URO, i slobodni i konjugovani, se vezuju za Sudlow I mesto sa najvećom energijom. Pored ovog vezivnog mesta, URO se vezuju za još jedno vezivno mesto na BSA molekulu samo sa nižom energijom. Drugo vezivno mesto je različito za nekonjugovane i konjugovane URO.

Drugo mesto vezivanja visokog afiniteta za nekonjugovane URO nalazi se na subdomenu IIIB BSA i preklapa se sa mestom vezivanja masnih kiselina 5 (FA5). Ovo mesto vezivanja se sastoji od nepolarnih i aromatičnih amino kiselinskih ostataka. Glavne interakcije sa nekonjugovanim URO su: π - π slaganje, π - π interakcije T-oblika, π -alkil i van der Waalsove interakcije. Samo jedna vodonična veza

se formira sa karbonilnom grupom iz Val 575. Na osnovu rezultata dokinga, vezivanje za ovo mesto je nešto manje povoljno (**tabela 9**) i verovatno se za njega vezuju kada se vezivno mesto Sudlow I zasiti (**slika 30 A**). Međutim, zbog male veličine i veoma nepolarne prirode vezivnog mesta FA5, šećerna grupa konjugovanih URO se ne može smestiti i doking studija nije pronašla nijedan konjugovani URO koji može da se veže na ovo mesto.

Drugo mesto vezivanja visokog afiniteta za glikozilovane URO nalazi se u rascepu između subdomena IIA i IIIA poznato kao međudomenska šupljina. Ova šupljina je takođe poznata strukturna osobina BSA, HSA i ostalih SA i sastoji se uglavnom od polarnih i naelektrisanih aminokiselina (**slika 30 B**) i formiraju se brojne vodonične veze i katjon- π interakcije sa konjugovanim URO ligandima.



Slika 30. 2D dijagrami interakcija protein-ligand u međudomenskoj šupljini za **A)** URO A, **B)** URO AG (brojevi ostataka odgovaraju brojevima ostataka u PDB strukturi 4F5S; internet stranica: <https://www.rcsb.org/structure/4F5S>).

Tabela 9. Energije vezivanja (kcal) liganada URO A, URO B, URO AG i URO BG u dva najjača vezivna mesta na BSA molekulu

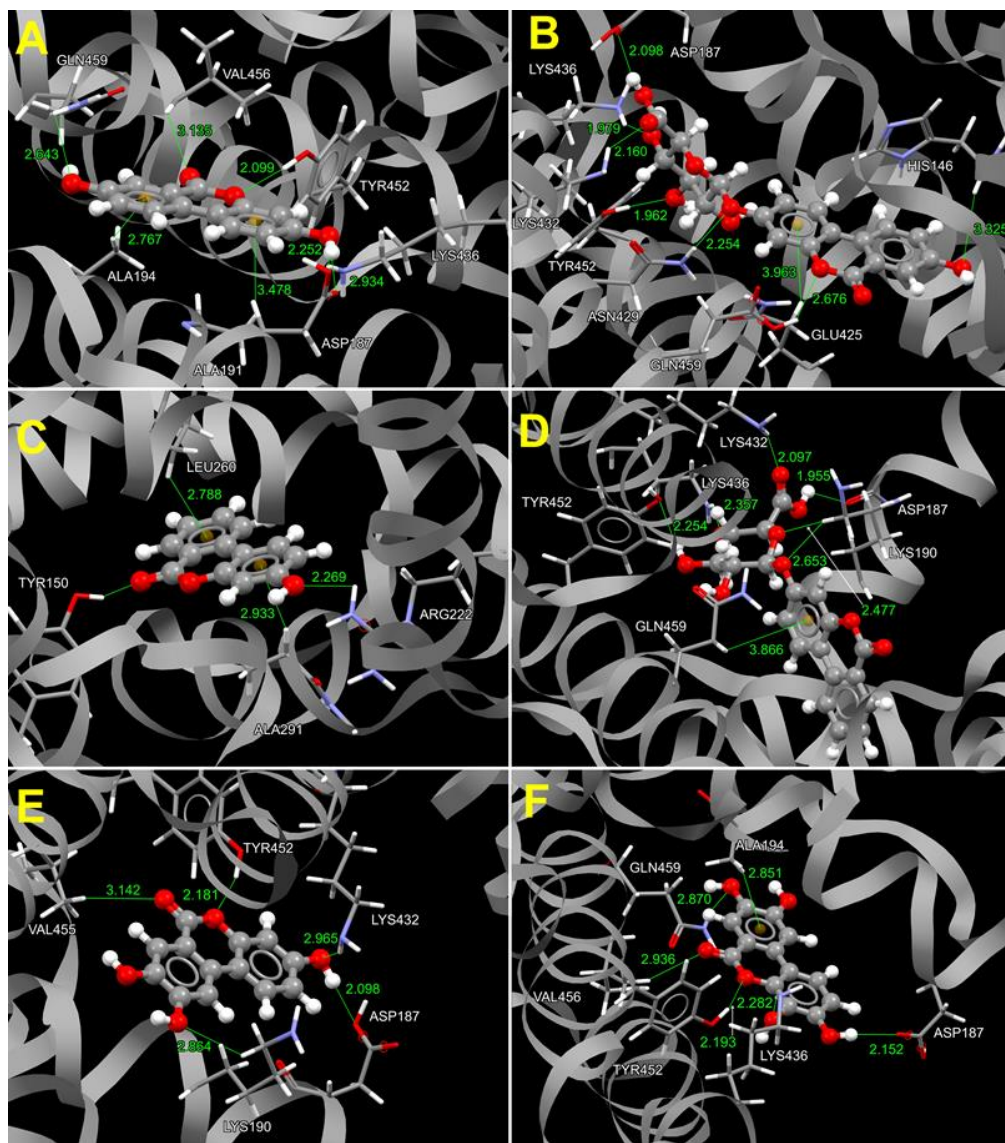
Vezivno mesto/ligand	URO A	URO B	URO AG	URO BG
Sudlow vezivno mesto I	8.8	8.6	10.4	10.7
FA5/Subdomen IIIB	8.4	8.6	/	/
Međudomenska šupljina	/	/	9.5	10.5

5.8.2 Molekulski doking HSA-URO kompleksa

Dobro je poznato da HSA ispoljava izvanrednu sposobnost vezivanja liganda na višestrukim vezivnim mestima. Ligandi koji se vezuju za HSA mogu biti različita endogena i egzogena jedinjenja male molekulske težine, kao i peptidi i proteini [31]. Eksperimentalna merenja se mogu dodatno upotpuniti molekulskim dokingom. Ovakav pristup doprinosi boljem razumevanju strukturne hemije i molekulskom prepoznavanju kroz geometrijsku analizu protein-ligand interakcija. Stoga je molekulski doking izveden na URO i slobodnom HSA molekulu (bez liganda). Rezultati studije molekulskog dokinga dati su u **tabeli 10**, dok su na **slici 31** prikazani rezultati simulacija pristajanja svih šest URO.

Tabela 10. Ukupna energija vezivanja (E_{tot} u kcal mol^{-1}) i efikasnost liganda (kcal mol^{-1} teški atom $^{-1}$) za ligande URO A, URO AG, URO B, URO BG, URO C i URO D izračunata metodom molekulskog dokinga.

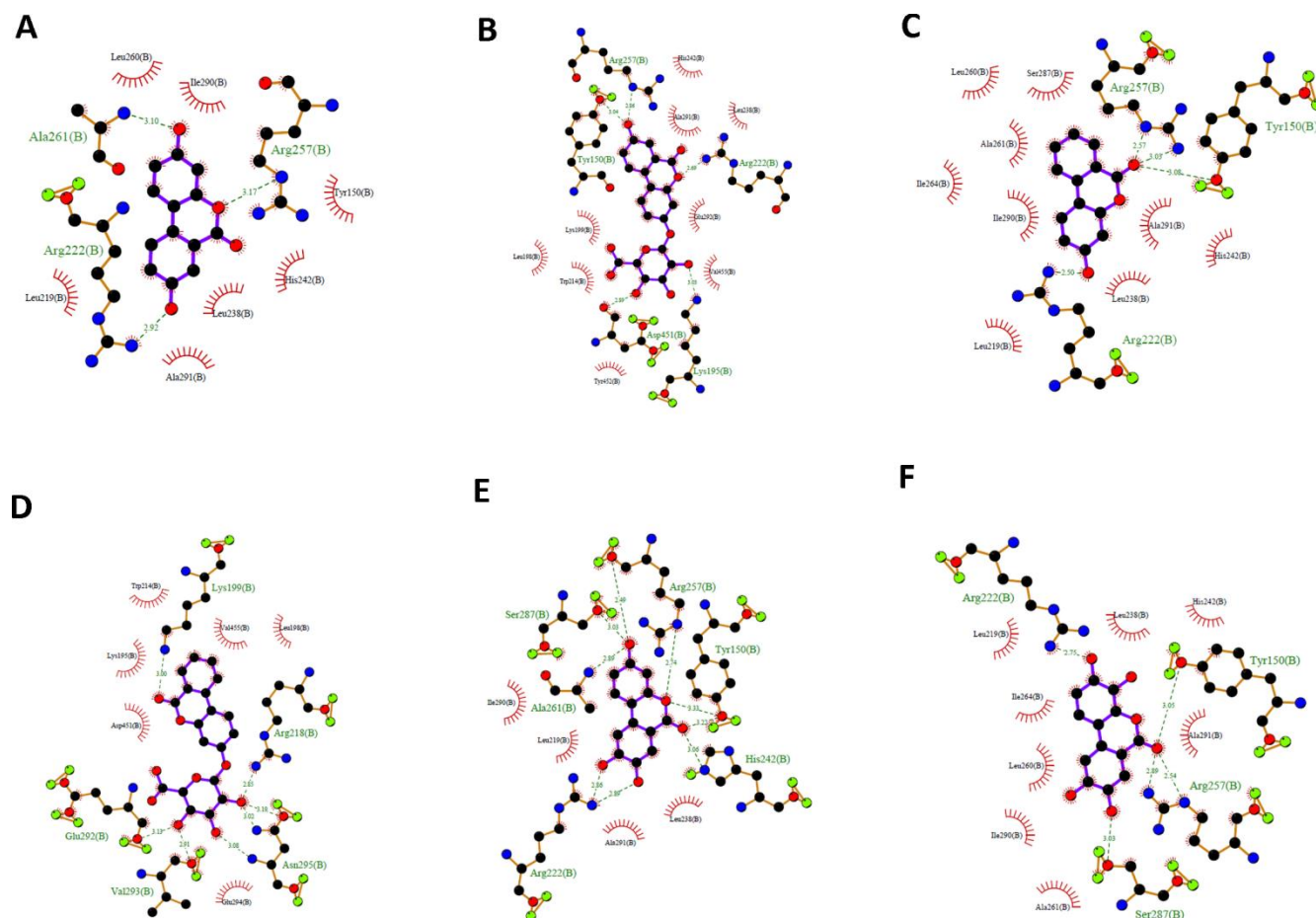
Ligandi	URO A	URO AG	URO B	URO BG	URO C	URO D
E_{tot} (kcal mol^{-1})						
Sudlow I mesto	-11.50	-13.59	-11.97	-13.35	-11.57	-11.38
FA9/Međudomenska šupljina	-11.53	-16.03	-11.86	-15.02	-13.14	-12.29
Efikasnost liganda, LE (kcal mol^{-1} teški atom $^{-1}$)						
Sudlow I mesto	-0.68	-0.68	-0.70	-0.64	-0.64	-0.60
FA9/Međudomenska šupljina	-0.68	-0.80	-0.70	-0.72	-0.73	-0.65



Slika 31. 3D bioaktivne konformacije **A)** URO A u FA9, **B)** URO AG u FA9, **C)** URO B u Sudlow I mestu i **D)** URO BG u FA9, **E)** URO C u FA9 i **F)** URO D u FA9, prikazane u obliku lopte i štapa, sa odgovarajućim molekulskim okruženjem u šupljini. Aminokiseline koje interaguju sa ligandima nekovalentnim interakcijama (zelene linije) prikazane su po modelu štapića sa troslovnim kodom i rednim brojem u sekvenci proteina. Težišta aromatičnih prstenova prikazana su kao oker sfere. Aminokiseline i atomi liganda su predstavljeni sledećim bojama (siva boja predstavlja urolitinsko ugljenično jezgro, crvena boja predstavlja atome kiseonika, a bela predstavlja atome vodonika iz hidroksilne grupe).

Zajednička karakteristika nekonjugovanih URO, URO A i URO B, jeste skoro jednak afinitet za Sudlow I i FA9 vezivna mesta, što se vidi iz skoro identičnih E_{TOT} i LE (**Tabela 10**). Oni su pozicionirani da prave klasične i/ili neklasične interakcije vodonika sa hidroksilom grupa Tyr150 u Sudlow I mestu, za koje se smatra da ima centralnu ulogu u interakciji sa lekovima [31].

Šematski crteži interakcija usidrenih URO u vezivnim mestima (Sudlow I i FA9/međudomenska šupljina) HSA molekula generisani korišćenjem LIGPLUS [125], prikazanih na slikama 32 i 33 redom.



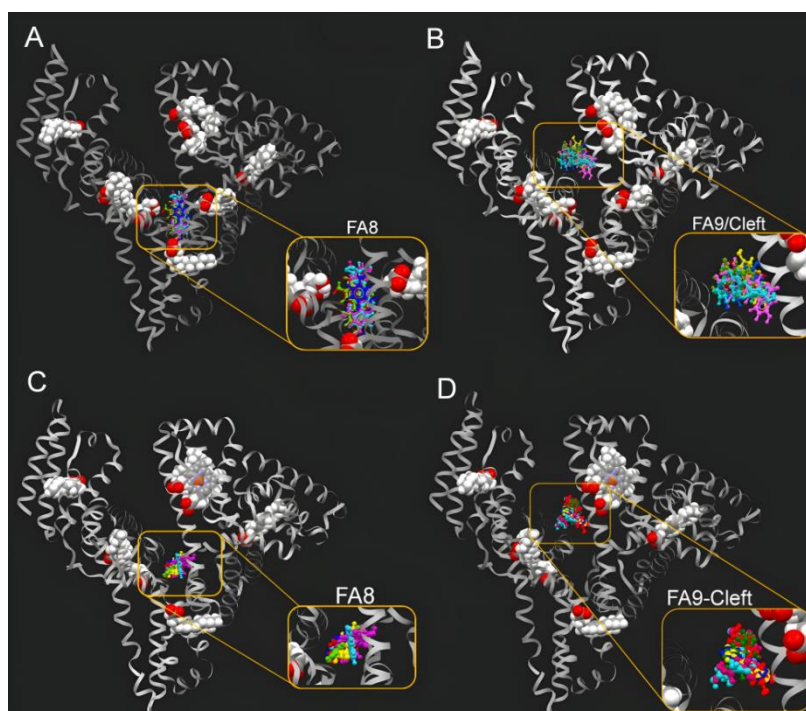
Slika 32. Šematski crteži interakcija prvog GOLD klastera **A)** URO A, **B)** URO AG, **C)** URO B, **D)** URO BG, **E)** URO C i **F)** URO D u Sudlow mestu I HSA molekula bez liganda (**PBD kod 1BM0**; internet stranica: <https://www.rcsb.org/structure/1bm0>) generisanih korišćenjem LIGPLUS. Isprekidane linije su vodonične veze, a 'trepavice' pokazuju ostatke uključene u hidrofobne interakcije.

U Sudlow I mestu URO A ostvaruje klasične interakcije vodonika sa Arg 257, Arg 222 i Ala 261, dok su hidrofobne interakcije uspostavljene sa ostacima Tyr 150, His 242, Leu 238, Ala 291, Leu 219, Leu 269 i Ile 290 (**slika 32**). Iako je hidrofobni deo URO B dominantniji nego u URO A, on takođe ostvaruje niz klasičnih i neklasičnih interakcija vodonika u Sudlow I mestu (**slika 32 C**). Deluje kao akceptor u dve C–H $\cdots$ π interakcije sa Leu 260 i Ala 291 i jednoj interakciji C–H $\cdots$ O sa Tyr 150. URO B je donor vodonika u interakciji vodonika sa amidnim kiseonikom iz Arg 257. Sa Tyr 150 postiže klasičnu O–H $\cdots$ O interakciju, dok sa Arg 222 postiže i N–H $\cdots$ O interakciju, jer oba ostatka deluju kao akceptori vodonika. Dominantne interakcije URO A i URO B u međudomenskoj šupljini kao drugom najjačem mestu vezivanja na HSA molekulu su prikazane u 2D dijagramima (**slika 32 A**) i **C**). Zbog većeg broja atoma kiseonika u poređenju sa prethodnim nekonjugovanim URO, URO C i URO D, preferiraju vezivanje za međudomensku šupljinu HSA molekula (**Tabela 10, Slika 32 E i F**). Oni ostvaruju veći broj klasičnih vodoničnih interakcija od prethodnih nekonjugovanih URO. URO C je ostvario interakciju vodonika sa Tyr 452, Lys 436, Arg 186 i Asp 187. Ostaci uključeni u

Kako bi se oponašali fiziološki uslovi, ligandi su vezani za vezivne džepove FA8 i FA9 FA- i hem-HSA, koji su relevantni za prepoznavanje tiroksina. Rezultati studije molekuskog dokinga dati su u **tabeli 10**, dok su na **slici 34** prikazani rezultati simulacija spajanja svih šest URO na FA8 i FA9 mesta.

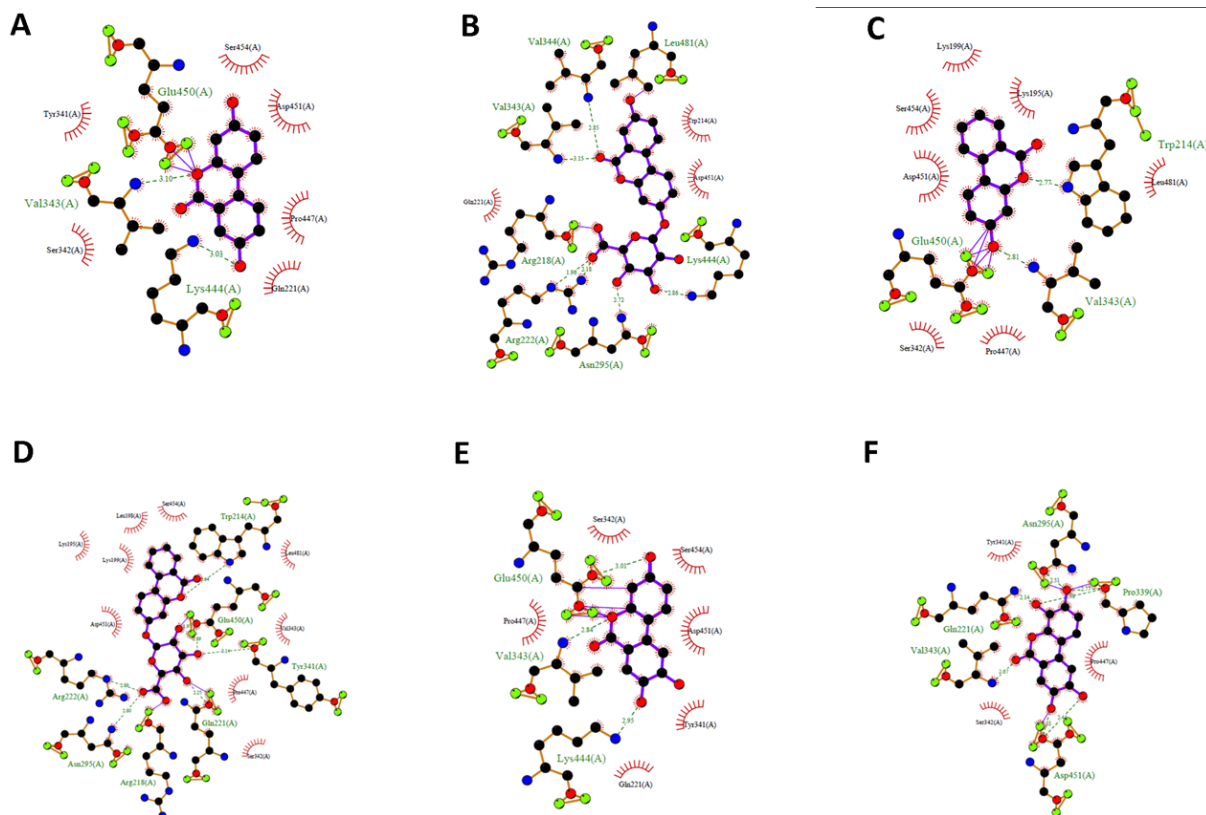
Tabela 10. Ukupna energija vezivanja (E_{tot} u kcal mol^{-1}) i efikasnost liganda (kcal mol^{-1} teški atom $^{-1}$) za URO A, URO AG, URO B, URO BG, URO C i URO D izračunata metodom molekuskog dokinga za FA8 i FA9 vezujuće mesto za FA-HSA i hem-HSA molekul.

Vezivno mesto		URO A	URO AG	URO B	URO BG	URO C	URO D
FA-HSA							
FA8	E_{tot}	-14.49	-17.29	-14.14	-18.61	-14.34	-14.29
	LE	-0.85	-0.86	-0.83	-0.89	-0.80	-0.75
FA9/ šupljina	E_{tot}	-14.58	-19.08	-13.99	-19.29	-14.47	-15.03
	LE	-0.86	-0.95	-0.82	-0.92	-0.80	-0.79
Hem-HSA							
FA8	E_{tot}	-12.92	-16.87	-13.40	-15.91	-13.46	-12.89
	LE	-0.76	-0.84	-0.79	-0.76	-0.75	-0.68
FA9/ šupljina	E_{tot}	-11.23	-16.99	-10.96	-16.24	-11.65	-11.84
	LE	-0.66	-0.85	-0.64	-0.77	-0.65	-0.62

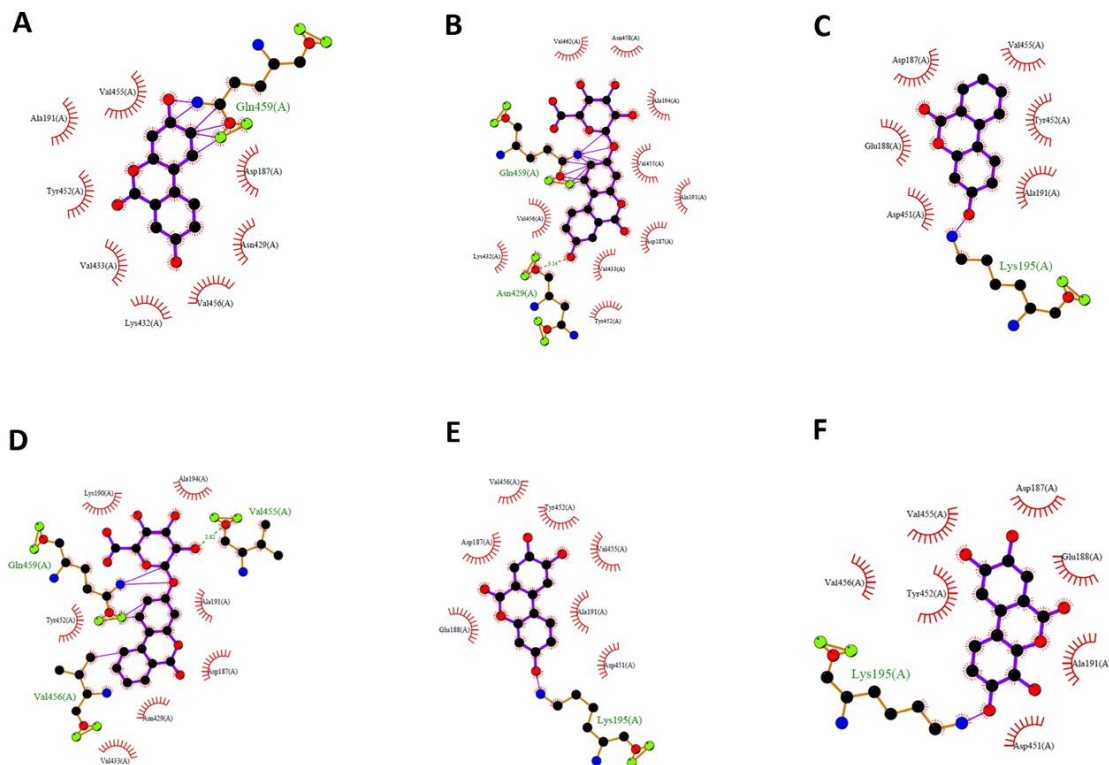


Slika 34. 3D bioaktivne konformacije URO A (tamno plava), URO AG (ružičasta), URO B (žuta), URO BG (svetlo plava), URO C (tamno zelena) i URO D (crvena) u **A)** FA-HSA FA8, **B)** FA-HSA FA9/šupljina, **C)** hem-HSA FA8, **D)** hem-HSA FA9/šupljina. Modeli popunjenih sfera korišćeni su za predstavljanje molekula hema i miristinske kiseline, dok su molekuli urolitina prikazani po modelu lopte i štapića.

Šematski crteži interakcija prvih GOLD klastera za URO ligande, generisanih korišćenjem LIGPLUS, prikazani su na **slikama 35-38**. Rezultati molekulskog dokinga su pokazali da su svi URO sposobni da se vežu za oba tiroksinska mesta (i FA8 i FA9/šupljina) na HSA molekulu koji za sebe već ima vezane ligande. Međutim, potrebne su dalje eksperimentalne studije da bi se potvrdili afiniteti vezivanja URO liganada.



Slika 35. Šematski crteži interakcija prvog GOLD klastera **A)** URO A, **B)** URO AG, **C)** URO B, **D)** URO BG, **E)** URO C i **F)** URO D u FA8 mestu hem-HSA molekula (PBD kod 1N5U; internet stranica <https://www.rcsb.org/structure/1n5u>) generisani korišćenjem LIGPLUS. Isprekidane linije su vodonične veze, a 'trepavice' pokazuju ostatke uključene u hidrofobne interakcije.



Slika 38. Šematski crteži interakcija prvog GOLD klastera **A)** URO A, **B)** URO AG, **C)** URO B, **D)** URO BG, **E)** URO C i **F)** URO D u FA9/međudomskoj šupljini FA-HSA molekula (PBD kod 8RCP; internet stranica <https://www.rcsb.org/structure/8RCP>) generisani korišćenjem LIGPLUS. Isprekidane linije su vodonične veze, a 'trepavice' pokazuju ostatke uključene u hidrofobne interakcije.

5.9. Analiza ekstrahovanog URO A iz vezikula

Izolovane ekstracelularne vezikule iz ćelijskog medijuma su metodom NTA analizirane. Određena im je koncentracija proteina (56,4 µg/ml), veličina partikula ($203,4 \pm 127.5$ nm) kao i broj partikula/ml ($2,7 \times 10^8$).

Tabela 11. Određivanje broja i veličine EV pomoću NTA

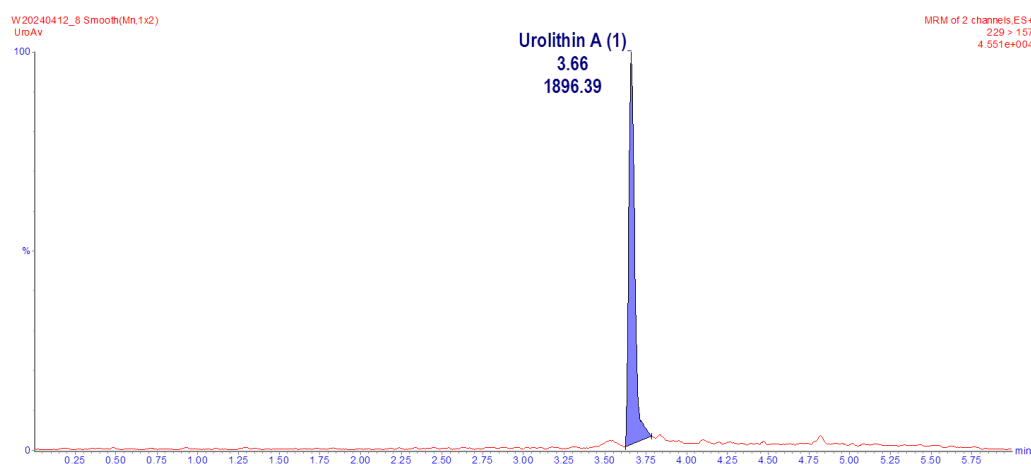
Uzorak	Zapremina (mL)	Prinos (broj partikula)	Prosečna veličina (nm)
HEK 293 ćelijska kultura	25 ml	$2,7 \times 10^8$	203.4 ± 127.9

Izolovane ekstracelularne vezikule su metodom pasivne inkorporacije pune sa URO A. Nakon pasivne inkorporacije URO A u ekstracelularne vezikule i ekstrakcije URO A iz istih, odrađena je tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom kako bi se utvrdilo prisustvo URO A. Ova metoda omogućava pouzdanu kvantifikaciju uzorka. Na **slikama u prilogu P4 i P5** nalaze se kalibracione prave za seriju standardnih rastvora URO A za MS/MS prelaz 228>128 i MS/MS prelaz

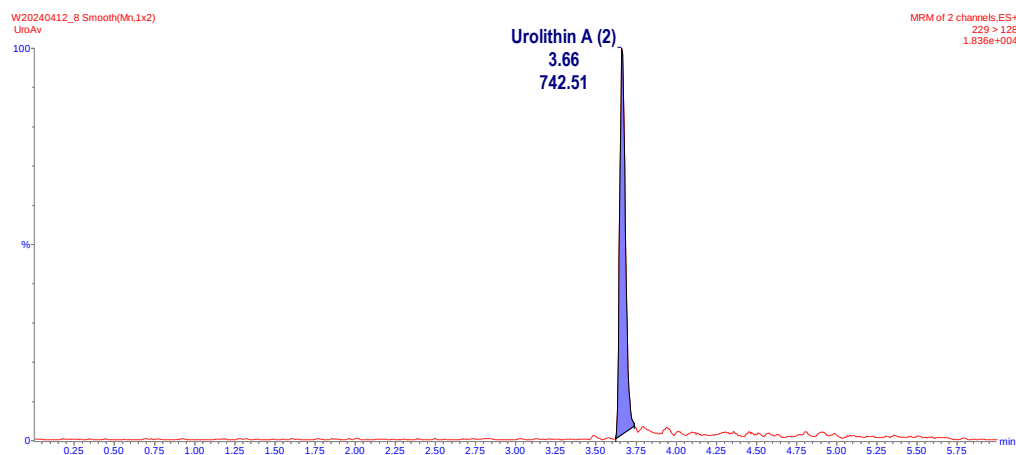
228>157U **tabelama P1 i P2** nalaze se podaci za kalibracionu pravu standarda urolitina za MS/MS 228>128 i za MS/MS 228>157. Na osnovu ovih prava izračunata je koncentracija URO A ekstrahovanog iz vezikula (**tabela 12**). Na **slikama 40 i 41** prikazani su hromatogrami uzorka URO A ekstrahovanog iz vezikula za prelaz MS/MS 228>157 i za prelaz MS/MS 228>128.

Tabela 12. Podaci za snimljene uzorke

Oznaka analita	Razblaženje	Posmatrani MS/MS	Retenciono vreme	Injekciona zapremina (mikroL)	Površina signala	Izračunata koncentracija na osnovu kalibracione prave	Koncentracija sa uračunatim razblaženjem
URO A	/	229>157	3.66	200	1896.388	1.6	1.6
URO A	/	229>128	3.66	200	742.51	1.5	1.5



Slika 42. Hromatogram uzorka UroA za prelaz MS/MS 228>157



Slika 43. Hromatogram uzorka UroA za prelaz MS/MS 228>128

Inkorporacija URO A (100 μ M) pasivnom difuzijom u vezikule je dala očekivano mali prinos. Dobijena koncentracija ekstrakta URO A iznosi 1.6 μ M.

6. DISKUSIJA

Urolitini predstavljaju jedinstvene sekundarne metabolite elaginske kiseline koji se ne nalaze u prirodi, već nastaju u digestivnom traktu kao rezultat interakcije između hrane i crevne mikrobiote. Hrana bogata elagitaninima, poput nara, orašastih plodova i bobičastog voća, služi kao prekursor za stvaranje urolitina, ali samo kod osoba čiji sastav crevne mikrobiote podržava ovu konverziju. Ovaj proces zavisi od mnogih faktora, uključujući ishranu, zdravlje digestivnog sistema i genetsku predispoziciju pojedinca. Smatra se da proizvodnja urolitina zavisi i od životne dobi individue, pri čemu se javlja kod oko 40 % starije ljudske populacije. Poslednjih godina stavljen je akcenat na proizvodnji dijetetskih suplemenata na bazi urolitina, čime se prevazilazi zavisnost od specifičnih sojeva mikrobiote. Osobama sa slabom proizvodnjom urolitina ovaj pristup omogućava bolje iskorišćavanje njihovih zdravstvenih benefita [13].

Nakon biosinteze u crevima, urolitini podležu apsorpciji u enterocitima i ulaze u sistemsku cirkulaciju. U ovom procesu URO se najčešće transformišu u glukuronidne i sulfatne konjugate, što omogućava njihovu bolju rastvorljivost i olakšava transport putem krvi. Ovi konjugati se vezuju za serumske albumine, dominantne proteine u plazmi, koji služe kao njihovi glavni nosači do različitih tkiva i organa. Struktura serumskih albumina, uključujući BSA i HSA temeljno je istražena, što im je omogućilo široku primenu u biohemijским istraživanjima. Zbog svoje sposobnosti da vežu širok spektar jedinjenja, kao što su lipidi, polifenoli, metalni joni i lekovi, serumski albumini su postali ključni modeli za ispitivanje protein-ligand interakcija. Ispitivanje interakcija URO sa serumskim albuminima je od velikog značaja radi boljeg razumevanja njihovog metabolizma, transporta kroz cirkulatorni sistem, kao i farmakološke aktivnosti. Afinitet vezivanja različitih slobodnih i konjugovanih URO za ove serumske proteine je procenjen spektroskopskim metodama kao i računarskim tehnikama.

BSA se u ovakvim istraživanjima koristi zbog svoje niske cene, lake dostupnosti i visoke sličnosti sa HSA [114]. BSA struktura je pretežno α -helikoidna sa 2 ostatka triptofana na poziciji 134 unutar subdomena IB i poziciji 213 unutar subdomena IIA [30]. Prvi ostatak se nalazi na površini molekula, dok je drugi u hidrofobnom džepu BSA [126, 127]. Oba ova ostatka poseduju intrinzičnu fluorescenciju. Fluorescencija potiče iz indola prisutnog u triptofanu. Apsorpcioni spektar ovog ostatka pojavljuje se na ~280 nm, a emisioni spektar na 340 nm. Na osnovu te činjenice gašenje fluorescencije se koristi za merenje afiniteta vezivanja.

U našoj studiji rezultati fluorescentne spektroskopije su pokazali da BSA vezuje ove metabolite na šta ukazuje smanjenje unutrašnje fluorescencije datog proteina sa povećanjem koncentracije URO. Vezivanje URO nije promenilo emisioni maksimum što ukazuje da nije došlo do promene mikrookruženja Trp ostatka. Da je bilo promene u strukturi proteina i izlaganja Trp ostatka na površini, došlo bi do crvenog pomeranja (ka većim talasnim dužinama). Ovi rezultati dalje sugerišu da nije bilo značajnijih konformacionih promena u BSA strukturi bez obzira na vezivanje URO. Takođe, *Xue i saradnici* su u svojoj studiji pratili vezivanje EA kao prekursora urolitina i URO B kao sekundarnog metabolita za BSA na pH 7.4 i 298 K fluorescentnom spektroskopijom. Njihovi rezultati su pokazali da ovi metaboliti smanjuju unutrašnju fluorescenciju proteina i ustanovili su da nema pomeranja emisionog maksimuma [128].

Stern-Volmerovi dijagrami ukazuju na mehanizam gašenja fluorescencije. Za URO B, URO AG i BG dobijena je linearna zavisnost gašenja fluorescencije od koncentracije liganada. To ukazuje da postoji jedan mehanizam gašenja fluorescencije i da ovi molekuli interaguju simultano sa oba Trp ostatka u BSA molekulu. Naši rezultati su u korelaciji sa rezultatima *Xue i saradnika* za EA i URO B.

Stern-Volmerov dijagram za EA i URO B je pokazao linearnost što ukazuje na prisustvo jednog mehanizma vezivanja [128]. Za URO A nije dobijena linearnost Stern-Volmerovog dijagrama koja se objašnjava prisustvom mešovitog tipa gašenja fluorescencije.

Dobijene vrednosti K_{sv} za ispitivane URO su 10^4 M^{-1} . Konstante ovog reda veličine sugerišu na umereni afinitet vezivanja za BSA. Vrednosti K_q su reda veličine 10^{12} . Ukoliko su konstante veće od 10^{10} smatra se da dolazi do statičkog gašenja fluorescencije BSA, odnosno do formiranja protein-ligand kompleksa. Takođe, Stern-Volmerove konstante za EA i URO B su reda veličine 10^4 - 10^5 . Za EA i URO B je prijavljeno da gase BSA fluorescenciju konstantom gašenja od 10^{12} što je nekoliko redova veličine veća od maksimalne vrednosti difuzijom ograničene protein-ligand interakcije u vodenoj sredini [128]. *Rashtbari* i saradnici su ispitali vezivanje EA, URO A i URO B za BSA na četiri različite temperature (298 K, 303 K, 310 K i 313 K) kako bi sa sigurnošću mogli da utvrde koji je mehanizam gašenja fluorescencije BSA. Zaključili su da je mehanizam gašenja statički na osnovu opadanja K_q sa porastom temperature. Ovako dobijeni rezultati su u korelaciji sa našim rezultatima za URO B [30]. Međutim, u našoj studiji je primenjena znatno veća koncentracija URO A (do 30 μM), pri kojima se uočava da Stern-Volmerov dijagram nije linearan. Odstupanje od linearnosti se javlja pri koncentraciji od 20 μM . Na osnovu tog rezultata je zaključeno da je mehanizam gašenja mešovit.

Razlika u strukturi i funkcionalnim grupama dovodi do različitih afiniteta ka BSA molekulu. URO A ima dva donora vodonika u dve hidroksilne grupe u poređenju sa URO B koji ima jednu hidroksilnu grupu i samim tim jedan donor vodonika. Ta razlika u strukturi omogućava URO A građenje većeg broja vodoničnih veza, što dalje vodi ka većem afinitetu URO A za BSA. Na to ukazuje i dobijena vrednost konstante gašenja fluorescencije. Veća hidrofobnost i količina donorskih grupa vodonika, kao što je pronađeno u URO A i URO B, povezana je sa većim kapacitetom gašenja fluorescencije proteina. Štaviše, URO sa većim brojem hidroksilnih grupa imaju bolji kapacitet gašenja fluorescencije za razliku od konjugovanih molekula. Zbog većeg afiniteta vezivanja za BSA biodostupnost aglikona je smanjena u cirkulaciji. BSA sadrži samo jedno mesto vezivanja za ove metabolite.

Studije molekulskog dokinga potvrđuju da se svi proučavani URO povoljno vezuju za BSA. Preferencijalno mesto vezivanja URO i njihovih konjugata je Sudlov I. Međutim, nekonjugovani URO takođe će se vezivati i za Sudlov II mesto kada su u višku, odnosno kada je prvo mesto vezivanja popunjeno. Konjugati URO se pored Sudlow I mesta, vezuju i za međudomensku šupljinu BSA, samo sa nižim afinitetom vezivanja. Oni ne mogu da se vežu za Sudlow II mesto zbog svoje robusne strukture. Dobijeni rezultati doprinose razumevanju mehanizma vezivanja slobodnih i konjugovanih URO za BSA, proširujući poznavanje farmakodinamike i načina transporta ovih važnih metabolita.

HSA molekul kao i BSA ima predominantnu α -helikoidnu strukturu. Međutim, razlika u strukturi između ova dva proteina se ogleda u broju Trp ostataka. HSA poseduje samo jedan Trp ostatak na poziciji 214 unutar subdomena IIA, od koga potiče unutrašnja fluorescencija. Vezivanje URO je ispitano na tri različite temperature metodom fluorescentne spektroskopije. Na datim temperaturama su i protein i ligand stabilni, što je preduslov za ispitivanje vezivanja URO za HSA. Rezultati fluorescentne spektroskopije su otkrili da se ispitani URO vezuju za HSA, na šta ukazuje smanjenje intenziteta fluorescencije karakterističnog pika na 360 nm. Sa povećanjem koncentracije svih URO dolazi do smanjenja intrinzične fluorescencije, ali ne i do promene oblika pika ili pomeranja emisionog maksimuma. Odsustvo plavog ili crvenog pomeranja sugerise da nema promena u mikrookruženju Trp ostatka, a samim tim i u strukturi HSA.

Za analizu gašenja fluorescencije HSA korišćen je modifikovani Stern-Volmerov dijagram. On se primenjuje kada standardni (linearni) Stern-Volmerov model ne pruža dovoljno informacija o složenosti interakcije između fluorofora i kvenčera. Iz ovih dijagrama dobijamo informacije da je mehanizam gašenja fluorescencije kombinacija statičkog i dinamičkog mehanizma.

Dobijene vrednosti konstante brzine gašenja (k_q) su reda veličine $10^{12} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ i daleko prevazilaze gornju granicu dinamičkog gašenja ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) na sve tri analizirane temperature. Iz ovih podataka se može zaključiti da je proces gašenja Trp fluorescencije kombinacija statičkog i dinamičkog mehanizma gašenja. Dvostruko-logaritamski grafik nam je omogućio da izračunamo broj vezivnih mesta. Vrednosti koje smo dobili bile su blizu 1, što ukazuje da postoji samo jedno vezivno mesto na HSA za URO. Vrednosti K_b su reda 10^4 - 10^5 M^{-1} , što ukazuje na umereni afinitet vezivanja. Sve izračunate K_b za HSA-URO komplekse pokazuju smanjenje sa povećanjem temperature.

Činjenica da su vrednosti promene Gibsove slobodne energije negativne ($\Delta G < 0$) na svim ispitanim temperaturama (298 K, 303 K i 310 K) pokazuje da je proces formiranja HSA-URO kompleksa termodinamički povoljan. Međutim, tokom nastanka HSA-URO kompleksa dolazi do smanjenja entropije, odnosno uređenost sistema raste, dok je ΔH negativan. Ako ΔS postane manje povoljna, termodinamički doprinos $-\Delta S$ postaje pozitivan, povećavajući ΔG . Ovo dalje ukazuje da proces vezivanja postaje manje povoljan sa porastom temperature. Smanjenje entropije dovodi do manje povoljnih uslova vezivanja sa temperaturnim porastom, kao što se vidi iz porasta ΔG . Konjugacija sa glukuronidima doprinosi temperaturnoj osetljivosti pri vezivanju liganda za protein. Tada dolazi do dodatne destabilizacije interakcija URO sa HSA na višim temperaturama. Glukuronidacija je smanjila afinitet vezivanja liganda za protein.

Kako bi se utvrdilo da li vezivanje URO za HSA izaziva značajne promene u njegovoj strukturi, snimani su CD i FT-IR spektri. Na osnovu fluorescentnih spektara se vidi da nema pomeranja emisionog maksimuma što ukazuje da nema narušavanja lokalnog okruženja Trp ostatka. FT-IR spektri unutar amidnog III regiona pokazuju očuvanje najdominantnije sekundarne strukture, α -heliksa, što ukazuje da primenjene koncentracije URO ne dovode do denaturacije HSA. Ovi rezultati su dodatno potvrđeni korišćenjem URO A u CD spektroskopiji. Dobijeni spektri nisu pokazali promene u sekundarnim strukturama HSA prilikom vezivanja URO, što ukazuje da vezivanje nije dovelo do destabilizacije proteina i/ili gubitka signaturnog helikoidnog aranžmana.

Sinhrona fluorescentna spektroskopija i molekularni doking korišćeni su za određivanje mesta vezivanja URO na HSA. Pošto URO gasi fluorescenciju oko Tyr i Trp ostataka istovremeno, sinhrona fluorescentna spektroskopija je otkrila da je Sudlow mesto I primarno mesto vezivanja za nekonjugovane urolitine. Međutim, doking studija vezivanja aglikona za slobodni HSA, predviđa da URO C i URO D preferiraju međudomensku šuplinu u odnosu na Sudlow mesto I, dok URO A i URO B, imaju skoro jednak afinitet za oba mesta vezivanja. Za konjugovane URO sinhrona fluorescentna spektroskopija pokazala je jako malu promenu u maksimumima talasne dužine emisije Tyr i Trp ostataka. Međutim, doking studija ukazuje na to da je za konjugovane URO međudomenska šupljina primarno mesto vezivanja na HSA molekul. Pošto je GOLD optimizovan za predviđanje vezivanja konformacija liganada, a ne afiniteta vezivanja, neophodne su dalje eksperimentalne studije. Te studije bi podrazumevale simulaciju molekulske dinamike neophodne za potvrdu afiniteta vezivanja URO. Dobijeni podaci mogu se koristiti kao osnova za modulaciju potencijalnog režima doziranja URO. Da bi se oponašali fiziološki uslovi, ligandi su vezani za vezne džepove FA8 i FA9 FA- i heme-HSA, koji su relevantni za prepoznavanje tiroksina. Rezultati spajanja su pokazali da su svi URO sposobni da se vežu za oba mesta prepoznavanja tiroksina HSA proteina vezanih za ligand.

Pored serumskih proteina postoje i drugi transporteri biološki aktivnih jedinjenja u cirkulatornom sistemu. Poslednjih godina predmet intenzivnih istraživanja postale su ekstracelularne vezikule kao prirodni transporteri i to zahvaljujući svom prirodnom poreklu, sposobnosti prolaska kroz biološke barijere, uključujući krvno-moždanu barijeru, niskoj imunogenosti i malim dimenzijama. Membranski lipidni dvosloj koji štiti unutrašnju hidrofilnu sredinu je idealna osobina EV za transport kako hidrofobnih tako i hidrofilnih jedinjenja. Sve navedene osobine su izdvojile EV kao idealne nanosisteme za dostavu bioaktivnih jedinjenja uključujući polifenolna jedinjenja [129]. Ova jedinjenja prisutna u hrani biljnog porekla poznata su po brojnim biološkim aktivnostima. Međutim, polifenoli imaju nisku biodostupnost, što znači da samo mali deo unetih polifenola u netaknutom obliku dospeva u krvotok. Nakon apsorpcije, enzimi faze II (uglavnom glukuronil i sulfat transferaze) intenzivno metabolišu polifenole, stvarajući konjugovane metabolite, pretežno glukuronide i sulfate, koji pokazuju znatno manju aktivnost u poređenju sa njihovim prekursorima [130, 131].

U ovom radu ispitali smo mogućnost inkorporacije biljnog polifenola urolitina A, predstavnika klase metabolita elaginske kiseline, u EV. Kao jedan od najjednostavnijih pristupa, pasivna difuzija se pokazala kao dobra metoda za inkorporaciju URO A u vezikule. Ova metoda ne zahteva upotrebu agresivnih hemikalija, složene aparature ili kompleksnih postupaka, što omogućava očuvanje integriteta kako membranske strukture vezikula, tako i samog jedinjenja. Pored toga, inkorporacija URO A u vezikule može pružiti dodatnu zaštitu od oksidacije, enzimske konjugacije i drugih oblika degradacije, čime se povećava biodostupnost i efikasnost ovog bioaktivnog jedinjenja. *González-Sarrías i saradnici* su 2022. godine objavili da su uspešno inkorporirali biljne polifenole, kurkumin i resveratrol, u vezikule iz kravljeg mleka. Koristili su tri različite metode: pasivnu inkubaciju, elektroporaciju i sonifikaciju, za inkorporaciju ovih jedinjenja. Kao najproduktivnija metoda se pokazala pasivna inkubacija sa prinosom od 2 μM za kurkumin i čak 15 μM za resveratrol [67].

Međutim, izazov u ovom pristupu predstavlja relativno mali prinos ekstrahovanog URO A, što zahteva optimizaciju uslova za inkorporaciju. Ključni parametri uključuju temperaturu i pH vrednost, koji značajno utiču na efikasnost pasivne difuzije i stabilnost vezikula. Studije su pokazale da blago kiseli pH i temperature bliske fiziološkim vrednostima povećavaju efikasnost inkorporacije polifenola, dok istovremeno smanjuju rizik od destabilizacije membrana.

Ova strategija naglašava potencijal ekstracelularnih vezikula kao nosilaca za polifenole, čime se otvara mogućnost za razvoj novih terapijskih platformi za preciznu i ciljanu dostavu bioaktivnih jedinjenja. Dalja istraživanja su potrebna kako bi se dodatno optimizovala metoda inkorporacije.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu iznetih rezultata u ovoj disertaciji zaključujemo

- **Vezivanje URO za BSA molekul:**

- ✓ *Urolitini se vezuju za BSA molekul smanjujući njegovu unutrašnju fluorescenciju.*
- ✓ *Fluorescentni spektri pokazuju karakteristični pik na 350 nm bez pomeranja emisionog maksimuma.*
- ✓ *Stern-Volmerova konstanta za sve ispitane URO ukazuje na umereni afinitet vezivanja.*
- ✓ *URO A se vezuje mešovitim mehanizmom za BSA molekul.*
- ✓ *Mehanizam vezivanja URO B i glukuronida URO A i URO B je statički.*
- ✓ *URO A ima veći afinitet za BSA od URO B zbog mogućnosti građenja većeg broja vodoničnih veza.*
- ✓ *Slobodni URO imaju veći afinitet vezivanja u odnosu na konjugovane što se ogleda u smanjenju njihove biodostupnosti u cirkulaciji.*
- ✓ *Studije molekulskog dokinga pokazuju da se svi proučavani URO povoljno vezuju za Sudlow I mesto.*
- ✓ *Slobodni URO se mogu vezati i za Sudlow II mesto, dok se konjugovani URO mogu vezati za međudomensku šupljinu BSA, samo sa nižim afinitetom vezivanja nego u prvom vezivnom mestu.*

- **Vezivanje URO za HSA molekul:**

- ✓ *Urolitini se vezuju za HSA molekul smanjujući njegovu unutrašnju fluorescenciju na tri različite temperature.*
- ✓ *Fluorescentni spektri pokazuju karakteristični pik na 360 nm bez pomeranja emisionog maksimuma.*
- ✓ *Stern-Volmerova konstanta za sve ispitane URO na datim temperaturama ukazuje na umereni afinitet vezivanja.*
- ✓ *Svi ispitani URO se vezuju mešovitim mehanizmom za HSA molekul.*
- ✓ *Broj izračunatih vezivnih mesta za sve URO iznosi 1,*
- ✓ *Vezivanje URO za HSA je termodinamički povoljno i vođeno je enalpijskim faktorom.*
- ✓ *Proces vezivanja je manje povoljan na višim temperaturama.*
- ✓ *Konjugacija URO sa glukuronidima smanjuje njihov afinitet za HSA molekul.*
- ✓ *Ne dolazi do promena u strukturi molekula HSA prilikom vezivanja URO što pokazuju CD i FT-IR spektri.*
- ✓ *Sinhrona fluorescentna spektroskopija je pokazala da se nekonjugovani URO povoljno vezuju za Sudlov I mesto.*
- ✓ *Docking studija ukazuje da se slobodni URO A i URO B skoro jednakim afinitetom vezuju i za Sudlow I i za Sudlov II mesto, dok URO C i URO D preferiraju međudomensku šupljinu.*
- ✓ *Doking studija je pokazala da se konjugovani URO vezuju za međudomensku šupljinu HSA.*

- **Inkorporacija URO A u ekstracelularne vezikule:**

- ✓ *Inkorporacija URO A metodom pasivne difuzije u ekstracelularne vezikule dobijenih iz HEK 293 ćelija je moguća.*
- ✓ *Prinos ekstrahovanog URO A iz vezikula utvrđen LC-MS metodom 1.6 μ M.*

8. *LITERATURA*

1. Kang, I., Buckner, T., Shay, N. F., Gu, L., and Chung, S. (2016) Improvements in metabolic health with consumption of ellagic acid and subsequent conversion into urolithins: evidence and mechanisms, *Advances in nutrition*, **7**, 961-972,
2. Rossi, M., Erlebacher, J., Zacharias, D. E., Carrell, H., and Iannucci, B. (1991) The crystal and molecular structure of ellagic acid dihydrate: a dietary anti-cancer agent, *Carcinogenesis*, **12**, 2227-2232,
3. Clifford, M. N., and Scalbert, A. (2000) Ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food Agriculture*, **80**, 1118-1125,
4. Lipińska, L., Klewicka, E., and Sójka, M. (2014) The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **13**, 289-299,
5. González-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., and Crozier, A. (2010) Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy, *Journal of agricultural food chemistry*, **58**, 3933-3939,
6. Chen, P., Guo, Z., Chen, F., Wu, Y., and Zhou, B. (2022) Recent advances and perspectives on the health benefits of urolithin B, a bioactive natural product derived from ellagitannins, *Frontiers in Pharmacology*, **13**, 917266,
7. García-Villalba, R., Giménez-Bastida, J. A., Cortés-Martín, A., Ávila-Gálvez, M. Á., Tomás-Barberán, F. A., Selma, M. V., Espín, J. C., and González-Sarrías, A. (2022) Urolithins: a comprehensive update on their metabolism, bioactivity, and associated gut microbiota, *Molecular nutrition food research*, **66**, 2101019,
8. Djedjibegovic, J., Marjanovic, A., Panieri, E., and Saso, L. (2020) Ellagic acid-derived urolithins as modulators of oxidative stress, *Oxidative medicine cellular longevity*, **2020**, 5194508,
9. García-Villalba, R., Tomás-Barberán, F. A., Iglesias-Aguirre, C. E., Giménez-Bastida, J. A., González-Sarrías, A., Selma, M. V., and Espín, J. C. (2023) Ellagitannins, urolithins, and neuroprotection: Human evidence and the possible link to the gut microbiota, *Molecular Aspects of Medicine*, **89**, 101109,
10. Raimundo, A. F., Ferreira, S., Tomás-Barberán, F. A., Santos, C. N., and Menezes, R. (2021) Urolithins: diet-derived bioavailable metabolites to tackle diabetes, *Nutrients*, **13**, 4285,
11. Toney, A. M., Fox, D., Chaidez, V., Ramer-Tait, A. E., and Chung, S. (2021) Immunomodulatory role of urolithin A on metabolic diseases, *Biomedicines*, **9**, 192,
12. García-Villalba, R., Selma, M. V., Espín, J. C., and Tomás-Barberán, F. A. (2019) Identification of novel urolithin metabolites in human feces and urine after the intake of a pomegranate extract, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **67**, 11099-11107,

13. D'Amico, D., Andreux, P. A., Valdés, P., Singh, A., Rinsch, C., and Auwerx, J. (2021) Impact of the natural compound urolithin A on health, disease, and aging, *Trends in molecular medicine*, **27**, 687-699,
14. Zhao, H., Song, G., Zhu, H., Qian, H., Pan, X., Song, X., Xie, Y., and Liu, C. (2023) Pharmacological Effects of Urolithin A and Its Role in Muscle Health and Performance: Current Knowledge and Prospects, *Nutrients*, **15**, 4441,
15. Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P. A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-dit-Félix, A. A., Williams, E. G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., and Aebischer P. (2016) Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents, *Nature medicine*, **22**, 879-888,
16. Fang, E. F., Hou, Y., Palikaras, K., Adriaanse, B. A., Kerr, J. S., Yang, B., Lautrup, S., Hasan-Olive, M. M., Caponio, D., and Dan, X. (2019) Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease, *Nature neuroscience*, **22**, 401-412,
17. Shen, P.-X., Li, X., Deng, S.-Y., Zhao, L., Zhang, Y.-Y., Deng, X., Han, B., Yu, J., Li, Y., and Wang, Z.-Z. (2021) Urolithin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting aryl hydrocarbon receptor, *EBioMedicine*, **64**,
18. Vergroesen, P.-P., Kingma, I., Emanuel, K. S., Hoogendoorn, R. J., Welting, T. J., van Royen, B. J., van Dieën, J. H., and Smit, T. H. (2015) Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle, *Osteoarthritis cartilage*, **23**, 1057-1070,
19. Liu, H., Kang, H., Song, C., Lei, Z., Li, L., Guo, J., Xu, Y., Guan, H., Fang, Z., and Li, F. (2018) Urolithin A inhibits the catabolic effect of TNF α on nucleus pulposus cell and alleviates intervertebral disc degeneration in vivo, *Frontiers in pharmacology*, **9**, 412698,
20. Lin, J., Zhuge, J., Zheng, X., Wu, Y., Zhang, Z., Xu, T., Meftah, Z., Xu, H., Wu, Y., and Tian, N. (2020) Urolithin A-induced mitophagy suppresses apoptosis and attenuates intervertebral disc degeneration via the AMPK signaling pathway, *Free Radical Biology Medicine*, **150**, 109-119,
21. Larrosa, M., González-Sarriás, A., Yáñez-Gascón, M. J., Selma, M. V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., Tomás-Barberán, F., Dolara, P., and Espín, J. C. (2010) Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism, *The Journal of nutritional biochemistry*, **21**, 717-725,
22. Zou, D., Ganugula, R., Arora, M., Nabity, M. B., Sheikh-Hamad, D., and Kumar, M. R. (2019) Oral delivery of nanoparticle urolithin A normalizes cellular stress and improves survival in mouse model of cisplatin-induced AKI, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **317**, F1255-F1264,

23. Guada, M., Ganugula, R., Vadhanam, M., and Kumar, M. N. R. (2017) Urolithin A mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation and apoptosis in an experimental rat model, *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, **363**, 58-65,
24. Jing, T., Liao, J., Shen, K., Chen, X., Xu, Z., Tian, W., Wang, Y., Jin, B., and Pan, H. (2019) Protective effect of urolithin a on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice via modulation of inflammation and oxidative stress, *Food chemical toxicology*, **129**, 108-114,
25. Toney, A. M., Fan, R., Xian, Y., Chaidez, V., Ramer-Tait, A. E., and Chung, S. (2019) Urolithin A, a gut metabolite, improves insulin sensitivity through augmentation of mitochondrial function and biogenesis, *Obesity*, **27**, 612-620,
26. Xia, B., Shi, X. C., Xie, B. C., Zhu, M. Q., Chen, Y., Chu, X. Y., Cai, G. H., Liu, M., Yang, S. Z., and Mitchell, G. A. (2020) Urolithin A exerts antiobesity effects through enhancing adipose tissue thermogenesis in mice, *PLoS Biology*, **18**, e3000688,
27. Heilman, J., Andreux, P., Tran, N., Rinsch, C., and Blanco-Bose, W. (2017) Safety assessment of Urolithin A, a metabolite produced by the human gut microbiota upon dietary intake of plant derived ellagitannins and ellagic acid, *Food Chemical Toxicology*, **108**, 289-297,
28. Singh, A., Andreux, P., Blanco-Bose, W., Ryu, D., Aebischer, P., Auwerx, J., and Rinsch, C. (2017) Orally administrated urolithin A is safe and modulates muscle and mitochondrial biomarkers in elderly, *Innovation in Aging*, **1**, 1223-1224,
29. Andreux, P. A., Blanco-Bose, W., Ryu, D., Burdet, F., Ibberson, M., Aebischer, P., Auwerx, J., Singh, A., and Rinsch, C. (2019) The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans, *Nature Metabolism*, **1**, 595-603,
30. Rashtbari, S., Dehghan, G., Sadeghi, L., Sareminia, L., Iranshahy, M., Iranshahi, M., Khataee, A., and Yoon, Y. (2022) Interaction of bovine serum albumin with ellagic acid and urolithins A and B: Insights from surface plasmon resonance, fluorescence, and molecular docking techniques, *Food Chemical Toxicology*, **162**, 112913,
31. Fanali, G., Di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., and Ascenzi, P. (2012) Human serum albumin: from bench to bedside, *Molecular aspects of medicine*, **33**, 209-290,
32. Carvalho, J. R., and Machado, M. V. (2018) New insights about albumin and liver disease, *Annals of hepatology*, **17**, 547-560,
33. Lee, P., and Wu, X. (2015) Modifications of human serum albumin and their binding effect, *Current pharmaceutical design*, **21**, 1862-1865,
34. Wang, Y., Wang, L., Zhu, M., Xue, J., Hua, R., and Li, Q. X. (2019) Comparative studies on biophysical interactions between gambogic acid and serum albumin via multispectroscopic approaches and molecular docking, *Journal of Luminescence*, **205**, 210-218,

35. de Araújo Motta, A. A. E., de Castro, M. C. S., Silva, D., and Cortez, C. M. (2021) A mathematical model to estimate binding sites for ligands in HSA and BSA based on spectrofluorimetry, *Journal of Molecular Structure*, **1223**, 129224,
36. Sudlow, G., Birkett, D., and Wade, D. (1975) The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin, *Molecular pharmacology*, **11**, 824-832,
37. Ribeiro, A. G., Alves, J. E. F., Soares, J. C. S., dos Santos, K. L., Jacob, Í. T. T., da Silva Ferreira, C. J., dos Santos, J. C., de Azevedo, R. D. S., de Almeida, S. M. V., and de Lima, M. d. C. A. (2021) Albumin roles in developing anticancer compounds, *Medicinal Chemistry Research*, **30**, 1469-1495,
38. Punith, R., and Seetharamappa, J. (2012) Spectral characterization of the binding and conformational changes of serum albumins upon interaction with an anticancer drug, anastrozole, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy*, **92**, 37-41,
39. Espín, J. C., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., and Tomás-Barberán, F. (2013) Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far, *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, **2013**, 270418,
40. Lakowicz, J.R. (2006) Quenching of Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer: Boston, MA, USA, 2006; pp. 277–330,
41. dos Santos Rodrigues, F. H., Delgado, G. G., da Costa, T. S., and Tasic, L. (2023) Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts, *BBA advances*, **3**, 100091,
42. Campbell, K., Zappas, A., Bunz, U., Thio, Y. S., and Bucknall, D. G. (2012) Fluorescence quenching of a poly (para-phenylene ethynylenes) by C60 fullerenes, *Journal of Photochemistry Photobiology A: Chemistry*, **249**, 41-46,
43. Peng, M., Wang, Y., Wu, C., Cai, X., Wu, Y., Du, E., Zheng, L., and Fu, J. (2023) Investigating sulfonamides-Human serum albumin interactions: A comprehensive approach using multi-spectroscopy, DFT calculations, and molecular docking, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **683**, 149108,
44. Miller, J. (1979) *Recent advances in molecular luminescence analysis*.
45. Vo-Dinh, T. (1978) Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry, *Analytical Chemistry*, **50**, 396-401,
46. Kelly, S. M., and Price, N. C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function, *Current protein peptide science*, **1**, 349-384,
47. Baig, M. H., Rahman, S., Rabbani, G., Imran, M., Ahmad, K., and Choi, I. (2019) Multi-spectroscopic characterization of human serum albumin binding with cyclobenzaprine hydrochloride: insights from biophysical and in silico approaches, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 662,

48. Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C., and Proteomics. (2005) How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta -Proteins*, **1751**, 119-139,
49. Liu, Y., Xie, M.-X., Kang, J., and Zheng, D. (2003) Studies on the interaction of total saponins of panax notoginseng and human serum albumin by Fourier transform infrared spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy*, **59**, 2747-2758,
50. Purcell, M., Neault, J., Malonga, H., Arakawa, H., Carpentier, R., and Tajmir-Riahi, H. (2001) Interactions of atrazine and 2, 4-D with human serum albumin studied by gel and capillary electrophoresis, and FTIR spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta -Protein Structure Molecular Enzymology*, **1548**, 129-138,
51. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., and Andricopulo, A. D. (2015) Molecular docking and structure-based drug design strategies, *Molecules*, **20**, 13384-13421,
52. Torres, P. H., Sodero, A. C., Jofily, P., and Silva-Jr, F. P. (2019) Key topics in molecular docking for drug design, *International journal of molecular sciences*, **20**, 4574,
53. Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., and Liu, S.-Q. (2016) Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods, *International journal of molecular sciences*, **17**, 144,
54. Sousa, S. F., Fernandes, P. A., and Ramos, M. J. (2006) Protein–ligand docking: current status and future challenges, *Proteins: structure, function, bioinformatics*, **65**, 15-26,
55. Mares-Sámamo, S., and Garduño-Juárez, R. (2018) Computational modeling of the interactions of drugs with human serum albumin (HSA), *Computación y Sistemas*, **22**, 1123-1135,
56. Vega-Vásquez, P., Mosier, N. S., and Irudayaraj, J. (2020) Nanoscale drug delivery systems: from medicine to agriculture, *Frontiers in Bioengineering biotechnology*, **8**, 79,
57. Elsharkasy, O. M., Nordin, J. Z., Hagey, D. W., de Jong, O. G., Schiffelers, R. M., Andaloussi, S. E., and Vader, P. (2020) Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how?, *Advanced drug delivery reviews*, **159**, 332-343,
58. Barenholz, Y. C. (2012) Doxil®—The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *Journal of controlled release*, **160**, 117-134,
59. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., and Hua, S. (2015) Advances and challenges of liposome assisted drug delivery, *Frontiers in pharmacology*, **6**, 286,
60. Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., and Sun, D. (2017) Engineering exosomes as refined biological nanoplateforms for drug delivery, *Acta Pharmacologica Sinica*, **38**, 754-763,

61. Newman, L. A., Muller, K., and Rowland, A. (2022) Circulating cell-specific extracellular vesicles as biomarkers for the diagnosis and monitoring of chronic liver diseases, *Cellular Molecular Life Sciences*, **79**, 232,
62. Du, S., Guan, Y., Xie, A., Yan, Z., Gao, S., Li, W., Rao, L., Chen, X., and Chen, T. (2023) Extracellular vesicles: a rising star for therapeutics and drug delivery, *Journal of Nanobiotechnology*, **21**, 231,
63. Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses, *Nature reviews immunology*, **9**, 581-593,
64. Nowak, M., Górczyńska, J., Kołodzińska, K., Rubin, J., and Choromańska, A. (2023) Extracellular vesicles as drug transporters, *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 10267,
65. Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., and Schiffelers, R. M. (2016) Extracellular vesicles for drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*, **106**, 148-156,
66. Frydrychowicz, M., Kolecka-Bednarczyk, A., Madejczyk, M., Yasar, S., and Dworacki, G. (2015) Exosomes—structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer, *Scandinavian journal of immunology*, **81**, 2-10,
67. González-Sarriás, A., Iglesias-Aguirre, C. E., Cortés-Martín, A., Vallejo, F., Cattivelli, A., del Pozo-Acebo, L., Del Saz, A., López de Las Hazas, M. C., Dávalos, A., and Espín, J. C. (2022) Milk-derived exosomes as nanocarriers to deliver curcumin and resveratrol in breast tissue and enhance their anticancer activity, *International journal of molecular sciences*, **23**, 2860,
68. Zhang, M., Jin, K., Gao, L., Zhang, Z., Li, F., Zhou, F., and Zhang, L. (2018) Methods and technologies for exosome isolation and characterization, *Small Methods*, **2**, 1800021,
69. Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P.-Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., Soria, C. E., Oquin, S., Bonebreak, C. M., and Saracoglu, E. (2013) Current methods for the isolation of extracellular vesicles, *Biological chemistry*, **394**, 1253-1262,
70. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., and Gao, Z. (2017) Progress in exosome isolation techniques, *Theranostics*, **7**, 789,
71. Zeringer, E., Barta, T., Li, M., and Vlassov, A. V. (2015) Strategies for isolation of exosomes, *Cold Spring Harbor Protocols*, **2015**, pdb. top074476,
72. Gámez-Valero, A., Monguió-Tortajada, M., Carreras-Planella, L., Franquesa, M. I., Beyer, K., and Borràs, F. E. (2016) Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents, *Scientific reports*, **6**, 33641,
73. Hong, C. S., Muller, L., Boyiadzis, M., and Whiteside, T. L. (2014) Isolation and characterization of CD34+ blast-derived exosomes in acute myeloid leukemia, *PloS one*, **9**, e103310,

74. Filipović, L., Spasojević, M., Prodanović, R., Korać, A., Matijašević, S., Brajušković, G., De Marco, A., and Popović, M. (2022) Affinity-based isolation of extracellular vesicles by means of single-domain antibodies bound to macroporous methacrylate-based copolymer, *New Biotechnology*, **69**, 36-48,
75. Zhao, Z., Yang, Y., Zeng, Y., and He, M. (2016) A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis, *Lab on a Chip*, **16**, 489-496,
76. Wang, Y.-T., Shi, T., Srivastava, S., Kagan, J., Liu, T., and Rodland, K. D. (2020) Proteomic analysis of exosomes for discovery of protein biomarkers for prostate and bladder cancer, *Cancers*, **12**, 2335,
77. Shahjin, F., Chand, S., and Yelamanchili, S. V. (2020) Extracellular vesicles as drug delivery vehicles to the central nervous system, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **15**, 443-458,
78. Uddin, M. J., Mohite, P., Munde, S., Ade, N., Oladosu, T. A., Chidrawar, V. R., Patel, R., Bhattacharya, S., Paliwal, H., and Singh, S. (2024) Extracellular vesicles: The future of therapeutics and drug delivery systems, *Intelligent Pharmacy*, **2**, 312-328.
79. Lamichhane, T. N., and Jay, S. M. (2018) Production of extracellular vesicles loaded with therapeutic cargo, *Targeted Drug Delivery: Methods Protocols*, 37-47,
80. Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., and Kabanov, A. V. (2015) Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy, *Journal of controlled release*, **207**, 18-30,
81. Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R., and Stevens, M. M. (2015) Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins, *Journal of Controlled Release*, **205**, 35-44,
82. Kooijmans, S., Fliervoet, L., Van Der Meel, R., Fens, M., Heijnen, H., en Henegouwen, P. v. B., Vader, P., and Schiffelers, R. (2016) PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time, *Journal of Controlled Release*, **224**, 77-85,
83. Sato, Y. T., Umezaki, K., Sawada, S., Mukai, S.-a., Sasaki, Y., Harada, N., Shiku, H., and Akiyoshi, K. (2016) Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes, *Scientific reports*, **6**, 21933,
84. Nan, W., Zhang, C., Wang, H., Chen, H., and Ji, S. (2022) Direct modification of extracellular vesicles and its applications for cancer therapy: a mini-review, *Frontiers in chemistry*, **10**, 910341,
85. Antimisiaris, S. G., Mourtas, S., and Marazioti, A. (2018) Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery, *Pharmaceutics*, **10**, 218,

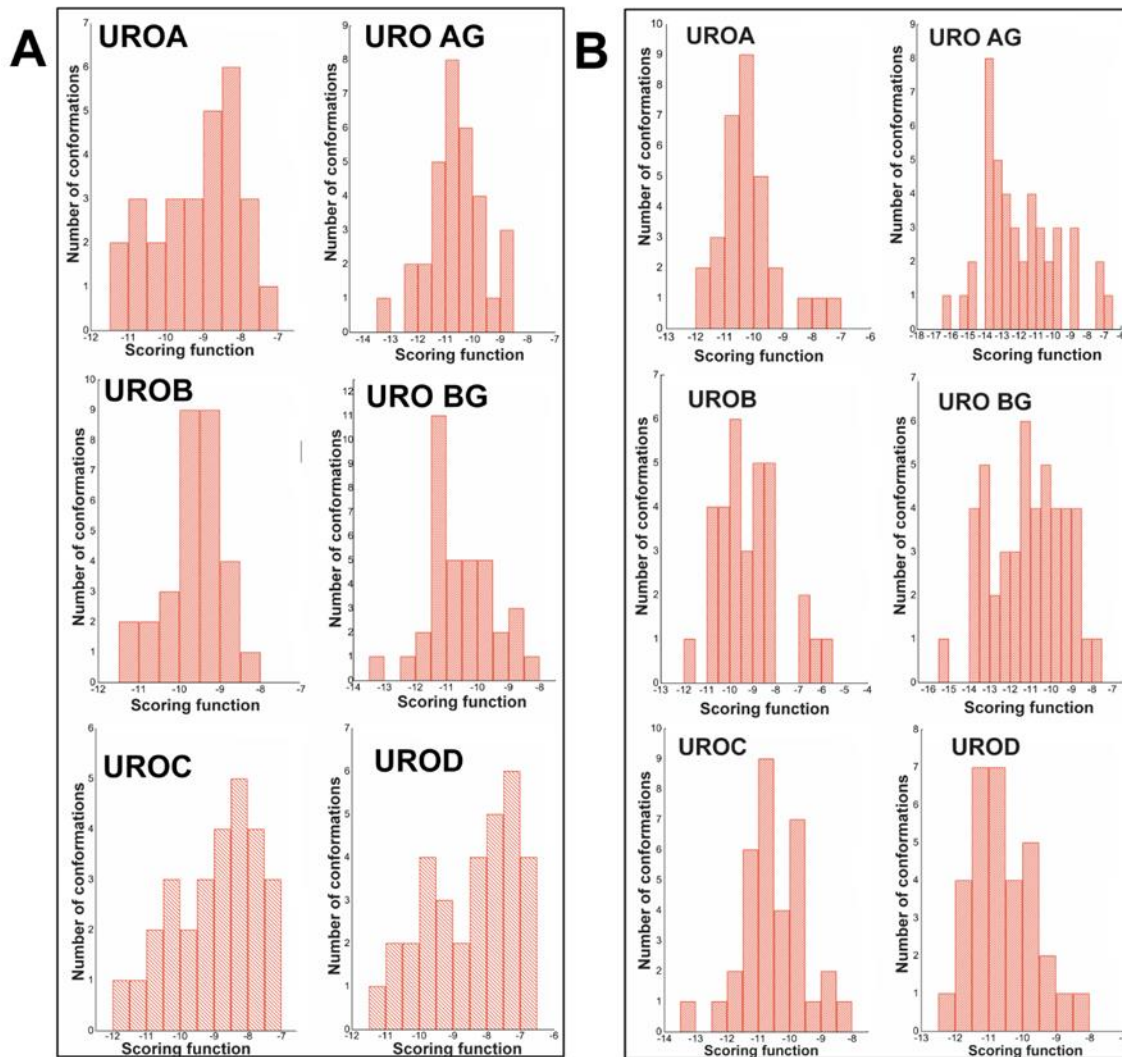
86. Adriano, B., Cotto, N. M., Chauhan, N., Jaggi, M., Chauhan, S. C., and Yallapu, M. M. (2021) Milk exosomes: Nature's abundant nanoplatform for theranostic applications, *Bioactive materials*, **6**, 2479-2490,
87. Meng, W., He, C., Hao, Y., Wang, L., Li, L., and Zhu, G. (2020) Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source, *Drug delivery*, **27**, 585-598,
88. González-Sarriás, A., Miguel, V. n., Merino, G., Lucas, R., Morales, J. C., Tomás-Barberán, F., Álvarez, A. I., and Espín, J. C. (2013) The gut microbiota ellagic acid-derived metabolite urolithin A and its sulfate conjugate are substrates for the drug efflux transporter breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP), *Journal of agricultural and food chemistry*, **61**, 4352-4359,
89. Birdsall, B., King, R. W., Wheeler, M. R., Lewis Jr, C. A., Goode, S. R., Dunlap, R. B., and Roberts, G. C. (1983) Correction for light absorption in fluorescence studies of protein-ligand interactions, *Analytical biochemistry*, **132**, 353-361,
90. Marković, O. S., Cvijetić, I. N., Zlatović, M. V., Opsenica, I. M., Konstantinović, J. M., Jovanović, N. V. T., Šolaja, B. A., and Verbić, T. Ž. (2018) Human serum albumin binding of certain antimalarials, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **192**, 128-139,
91. Seedher, N., and Bhatia, S. (2006) Reversible binding of celecoxib and valdecoxib with human serum albumin using fluorescence spectroscopic technique, *Pharmacological research*, **54**, 77-84,
92. He, J., Wang, Q., Zhang, L., Lin, X., and Li, H. (2014) Docking simulations and spectroscopy of the interactions of ellagic acid and oleuropein with human serum albumin, *Journal of luminescence*, **154**, 578-583,
93. Lima, S. A., Cordeiro-da-Silva, A., de Castro, B., and Gameiro, P. (2007) Sensitivity of P-glycoprotein tryptophan residues to benzodiazepines and ATP interaction, *Biophysical chemistry*, **125**, 143-150,
94. Hashempour, S., Shahabadi, N., Adewoye, A., Murphy, B., Rouse, C., Salvatore, B. A., Stratton, C., and Mahdavian, E. (2020) Binding studies of AICAR and human serum albumin by spectroscopic, theoretical, and computational methodologies, *Molecules*, **25**, 5410,
95. Becke, A. (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *The Journal of Chemical Physics*, **98**, 5648,
96. Lee, C., Yang, W., and Parr, R. G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Physical review B*, **37**, 785,
97. Frisch, M. (2009) gaussian 09, Revision d. 01, Gaussian, Inc, Wallingford CT, **201**,
98. Bujacz, A. (2012) Structures of bovine, equine and leporine serum albumin, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **68**, 1278-1289,

99. Anandakrishnan, R., Aguilar, B., and Onufriev, A. V. (2012) H++ 3.0: automating p K prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations, *Nucleic acids research*, **40**, W537-W541,
100. Mackerell Jr, A. D., Feig, M., and Brooks III, C. L. (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations, *Journal of computational chemistry*, **25**, 1400-1415,
101. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of computational chemistry*, **31**, 455-461,
102. Berman, H., Henrick, K., and Nakamura, H. (2003) Announcing the worldwide protein data bank, *Nature structural molecular biology*, **10**, 980-980,
103. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., and Kobayashi, K. (1999) Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein engineering*, **12**, 439-446,
104. Pomyalov, S., Minetti, C. A., Remeta, D. P., Bonala, R., Johnson, F., Zaitseva, I., Iden, C., Golebiewska, U., Breslauer, K. J., Shoham, G and Sidorenko V.S. (2024) Structural and mechanistic insights into the transport of aristolochic acids and their active metabolites by human serum albumin, *Journal of Biological Chemistry*, **300**, 107358,
105. Wardell, M., Wang, Z., Ho, J. X., Robert, J., Ruker, F., Ruble, J., Carter, D. C. (2002) The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å, *Biochemical and biophysical research communications*, **291**, 813-819,
106. Allinger, N. L. (1977) Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms, *Journal of the American Chemical Society*, **99**, 8127-8134,
107. Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., and Taylor, R. D. (2003) Improved protein–ligand docking using GOLD, *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics*, **52**, 609-623,
108. Jones, G., Willett, P., and Glen, R. C. (1995) Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation, *Journal of molecular biology*, **245**, 43-53,
109. Nissink, J. W. M., Murray, C., Hartshorn, M., Verdonk, M. L., Cole, J. C., and Taylor, R. (2002) A new test set for validating predictions of protein–ligand interaction, *Proteins: structure, function, bioinformatics*, **49**, 457-471,
110. Hartshorn, M. J., Verdonk, M. L., Chessari, G., Brewerton, S. C., Mooij, W. T., Mortenson, P. N., and Murray, C. W. (2007) Diverse, high-quality test set for the validation of protein– ligand docking performance, *Journal of medicinal chemistry*, **50**, 726-741,

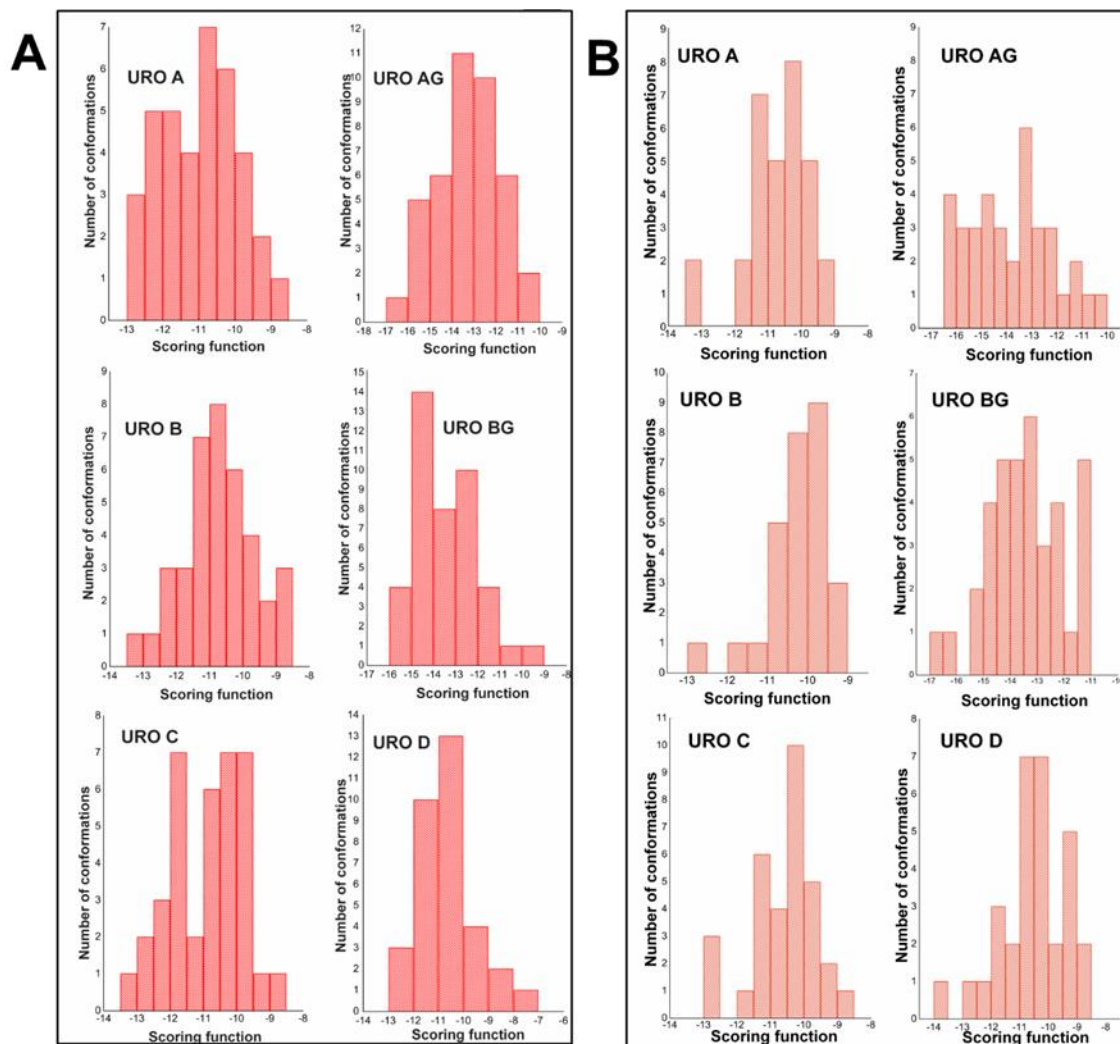
111. Wang, J., Ma, L., Zhang, Y., and Jiang, T. (2017) Investigation of the interaction of deltamethrin (DM) with human serum albumin by multi-spectroscopic method, *Journal of Molecular Structure*, **1129**, 160-168,
112. He, J., Wang, Q., Zhang, L., Lin, X., and Li, H. J. J. o. l. (2014) Docking simulations and spectroscopy of the interactions of ellagic acid and oleuropein with human serum albumin, *Journal of luminescence*, **154**, 578-583,
113. Hashempour, S., Shahabadi, N., Adewoye, A., Murphy, B., Rouse, C., Salvatore, B. A., Stratton, C., and Mahdavian, E. J. M. (2020) Binding studies of AICAR and human serum albumin by spectroscopic, theoretical, and computational methodologies, *Molecules*, **25**, 5410,
114. Roufegarinejad, L., Jahanban-Esfahlan, A., Sajed-Amin, S., Panahi-Azar, V., and Tabibiazar, M. (2018) Molecular interactions of thymol with bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking studies, *Journal of Molecular Recognition*, **31**, e2704,
115. Ross, P. D., and Subramanian, S. (1981) Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, *Biochemistry*, **20**, 3096-3102,
116. Cooper, A. (1999) Thermodynamic analysis of biomolecular interactions, *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 557-563,
117. Dockal, M., Carter, D. C., and Ruker, F. (1999) The three recombinant domains of human serum albumin: structural characterization and ligand binding properties, *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 29303-29310,
118. Trynda-Lemiesz, L. (2004) Paclitaxel–HSA interaction. Binding sites on HSA molecule, *Bioorganic medicinal chemistry*, **12**, 3269-3275,
119. Milošević, J., Prodanović, R., and Polović, N. J. M. (2021) On the protein fibrillation pathway: oligomer intermediates detection using ATR-FTIR spectroscopy, *Molecules*, **26**, 970,
120. Qin, C., Xie, M.-X., and Liu, Y. (2007) Characterization of the myricetin– human serum albumin complex by spectroscopic and molecular modeling approaches, *Biomacromolecules*, **8**, 2182-2189,
121. Greenfield, N. J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nature protocols*, **1**, 2876-2890,
122. Wang, Y.-q., Tang, B.-p., Zhang, H.-m., Zhou, Q.-h., and Zhang, G.-c. (2009) Studies on the interaction between imidacloprid and human serum albumin: spectroscopic approach, *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*, **94**, 183-190,
123. Zelenovic, N., Kojadinovic, M., Filipovic, L., Vucic, V., Milcic, M., Arsic, A., and Popovic, M. (2023) Interactions of Different Urolithins With Bovine Serum Albumin, *Natural Product Communications*, **18**, 1934578X231169366,

124. Wani, T. A., Bakheit, A. H., Abounassif, M., and Zargar, S. (2018) Study of interactions of an anticancer drug neratinib with bovine serum albumin: spectroscopic and molecular docking approach, *Frontiers in chemistry*, **6**, 47,
125. Laskowski, R. A., and Swindells, M. B. (2011) *LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery*. ACS Publications
126. Espín, J. C., González-Barrio, R., Cerdá, B., López-Bote, C., Rey, A. I., and Tomás-Barberán, F. A. (2007) Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **55**, 10476-10485,
127. Jayabharathi, J., Jayamoorthy, K., Thanikachalam, V., and Sathishkumar, R. (2013) Fluorescence quenching of bovine serum albumin by NNMB, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy*, **108**, 146-150,
128. Xue, P., Zhang, G., Zhao, H., Wang, W., Zhang, J., and Ren, L. (2022) Serum albumin complexed with ellagic acid from pomegranate peel and its metabolite urolithin B, *Food Bioscience*, **46**, 101618,
129. Lu, X., Fan, S., Cao, M., Liu, D., Xuan, K., and Liu, A. (2024) Extracellular vesicles as drug delivery systems in therapeutics: current strategies and future challenges, *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **54**, 785-802,
130. Iglesias-Aguirre, C. E., Cortés-Martín, A., Ávila-Gálvez, M. Á., Giménez-Bastida, J. A., Selma, M. V., González-Sarrías, A., and Espín, J. C. (2021) Main drivers of (poly) phenol effects on human health: metabolite production and/or gut microbiota-associated metabotypes?, *Food function*, **12**, 10324-10355,
131. Williamson, G. (2017) The role of polyphenols in modern nutrition, *Nutrition bulletin*, **42**, 226-235,

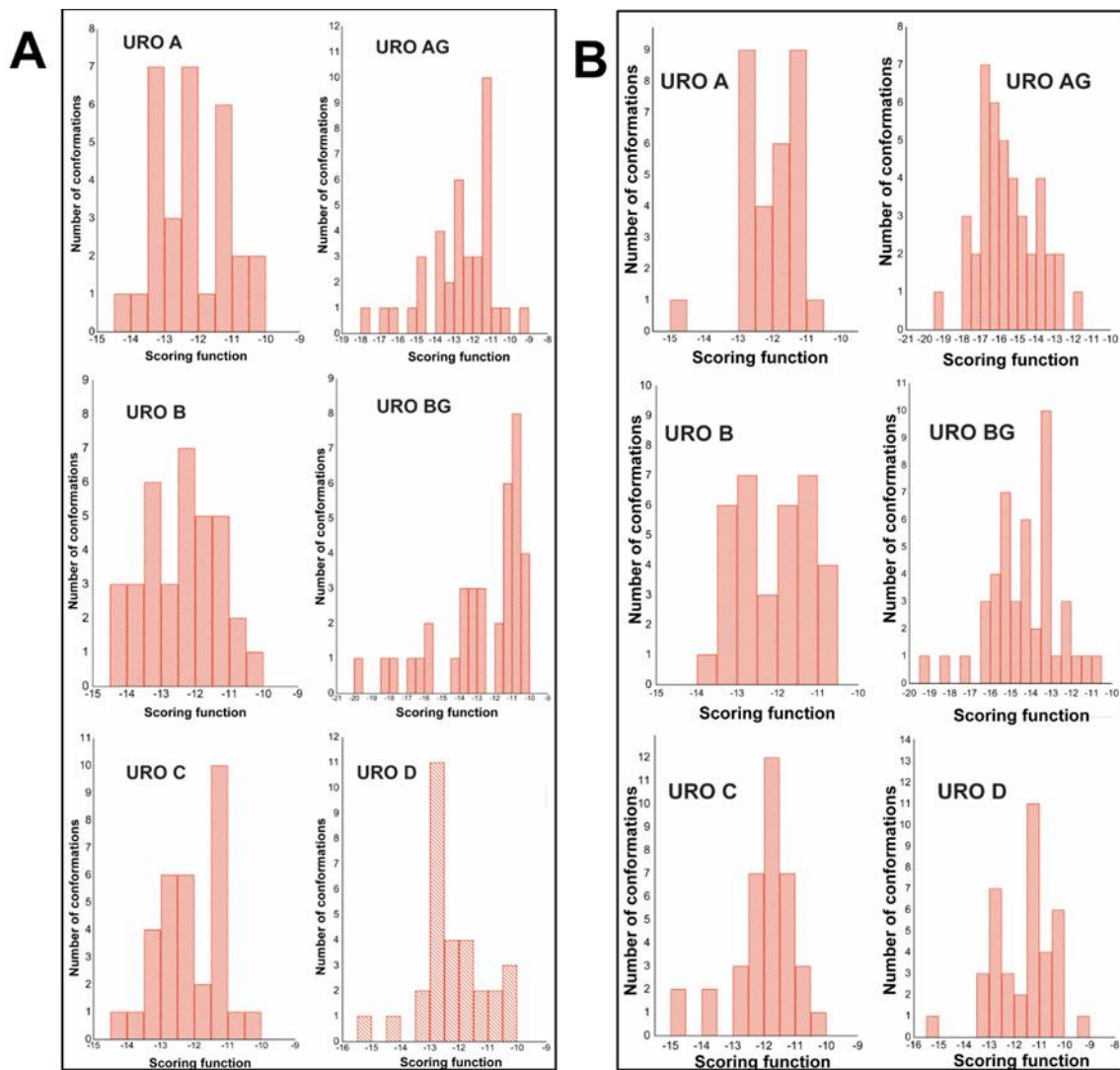
9. Prilog



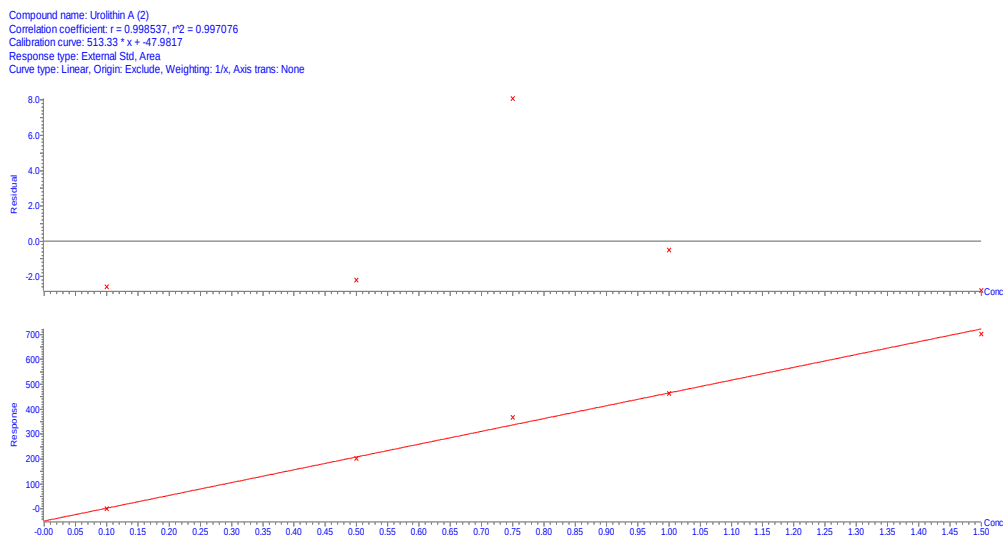
Slika P1. Klaster analiza rezultata dokinga URO na Sudlow mesto I (A) i na FA9//međudomensku šupljinu (B) kod HSA bez prisustva liganda (PDB ID 1BM0), korišćenjem RMSD vrednosti od 1,0 Å.



Slika P2. Klaster analiza rezultata dokinga URO na FA8 (**A**) i na FA9/međudomska šupljina (**B**) kod HSA molekula za koji su vezani heme-Fe(III) i miristinska kiselina (PDB ID 1N5U), korišćenjem RMSD vrednosti od 1,0 Å.



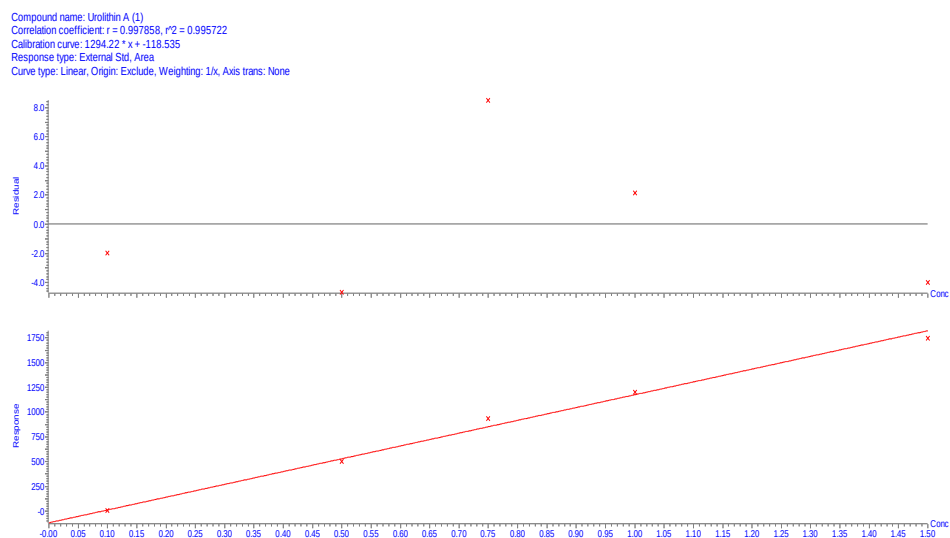
Slika P3. Klaster analiza rezultata dokinga URO na FA8 (**A**) i na FA9/međudomensku šupljinu (**B**) kod HSA molekula za koji je vezana miristinska kiselina (PDB ID 8RCP), korišćenjem RMSD vrednosti od 1,0 Å.



Slika P4. Kalibraciona za standarde UroA MS/MS prelaz 228>128

Tabela P1. Podaci za kalibracionu standarda urolitina za MS/MS 228>128

Koncentracija standarda (mikromM)	Retenciono vreme standarda	Injekciona zapremina (mikroL)	Površina signala	Izračunate koncentracije na osnovu kalibracione
0.1	3.65	200	2.032	0.1
0.5	3.64	200	203.021	0.5
0.75	3.65	200	368.132	0.8
1.0	3.65	200	462.706	1.0
1.5	3.65	200	700.521	1.5



Slika P5. Kalibraciona za standarde UroA MS/MS prelaz 228>157

Tabela P2. Podaci za kalibracionu standarda urolitina za MS/MS 228>157

Koncentracija standarda (mikroM)	Retenciono vreme standarda	Injekciona zapremina (mikroL)	Površina signala	Izračunate koncentracije na osnovu kalibracione
0.1	3.65	200	8.323	0.1
0.5	3.64	200	498.368	0.5
0.75	3.65	200	934.577	0.8
1.0	3.65	200	1203.389	1.0
1.5	3.65	200	1745.410	1.4

10. Biografija

Nevena (Dejan) Zelenović rođena je 21.02.1987. godine u Kragujevcu, Republika Srbija, SFRJ. Završila je osnovnu školu i opšti smer gimnazije u Svilajncu.

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu upisuje 2006. godine. Diplomirala je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija, 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,47. Izradom diplomskog rada je rukovodio profesor dr Bato Korać na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Diplomski rad „Molekulska osnova metaboličkog remodeliranja skeletnih mišića tokom aklimacije na hladnoću: uloga glutaciona“ je odbranila sa ocenom 10. Master akademske studije Biohemije upisala je 2011. godine, a završila 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,60 na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Master rad pod mentorstvom profesora dr Radivoja Prodanovića „Kloniranje i heterologna ekspresija mangan-peroksidaze iz gljive *Phanerochaete chrysosporium* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*“ odbranila je 2012. godine sa ocenom 10. Kandidatkinja upisuje 2022. godine doktorske akademske studije na Katedri za Biohemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Pod mentorstvom profesorke dr Milice Popović i naučne saradnice dr Milice Kojadinović izrađuje doktorsku disertaciju pod nazivom „Ispitivanje interakcija sekundarnih metabolita elaginske kiseline (urolitina) sa albuminima i ekstracelularnim vezikulama“. U Centru za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju zaposlila se 2013. godine, gde je prelazila iz zvanja istraživač pripravnik u istraživač saradnik i sada je u zvanju stručnog saradnika. Članica je sledećih društava: Biohemijskog društva Srbije i Srpskog društva za ekstracelularne vezikule.

Kandidatkinja se bavi naučno-istraživačkim radom iz oblasti biohemije koji podrazumeva ispitivanje interakcije između urolitina, metabolita elaginske kiseline, i serumskih albumina i ekstracelularnih vezikula, kao i bioloških aktivnosti samih urolitina. Autor je i koautor 5 radova publikovanih u međunarodnim časopisima, od kojih 2 rada čine deo doktorske teze. Autor je i koautor 5 saopštenja sa naučnih skupova, od kojih je jedno saopštenje iz doktorske disertacije.

Bibliografija

Objavljeni naučni radovi i saopštenja kandidatkinje:

- **Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M20) koji su integralni deo disertacije:**
 1. Zelenović, N., Ristić, P., Polović, N., Todorović, T., Kojadinović, M., & Popović, M. (2024). A Multi-Spectroscopic and Molecular Docking Analysis of the Biophysical Interaction between Food Polyphenols, Urolithins, and Human Serum Albumin. *Molecules*, 29(18), 4474.
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29184474>
(M21; IF 4,20; Kategorija: Biohemija i Molekularna biologija: 85/285 u 2023. g.).
 2. Zelenovic, N., Kojadinovic, M., Filipovic, L., Vucic, V., Milcic, M., Arsic, A., & Popovic, M. (2023). Interactions of Different Urolithins With Bovine Serum Albumin. *Natural Product Communications*, 18(5), 1934578X231169366.
DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X231169366>
(M23; IF 1,80; Kategorija: Hemija, Medicina: 49/60 u 2022. g.).
- **Drugi radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M20):**
 1. Zelenovic, N., Filipovic, L., & Popovic, M. (2023). Recent developments in bioprocessing of recombinant antibody fragments. *Biochemistry (Moscow)*, 88(9), 1191-1204.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297923090018>
(M23; IF 2,80; Kategorija: Biohemija i Molekularna Medicinabiologija: 206/285 u 2022. g.).
 2. Spasojevic, D., Prokopijevic, M., Prodanovic, O., Zelenovic, N., Polovic, N., Radotic, K., & Prodanovic, R. (2019). Peroxidase-sensitive tyramine carboxymethyl xylan hydrogels for enzyme encapsulation. *Macromolecular Research*, 27, 764-771.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13233-019-7111-7>
(M22; IF 2,05; Kategorija: Nauka o polimerima: 37/89 u 2019. g.).
 3. Tadić, V., Balaž, A. M., Petric, M., Milošević, S., Zelenović, N., Raspor, M., Tadić, J., & Prodanović, R. (2015). Cloning of the gene for a carbohydrate oxidase from *Lactuca sativa* in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Hemijska industrija*, 69(6), 689-701.
DOI: <https://doi.org/10.2298/HEMIND140823003T>
(M23; IF 0,437; Kategorija: Hemijski inženjering: 118/135 u 2015. g.).
- **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M30)**
 1. Zelenović, N., Filipović, L., Kojadinović, M., and Popović, M. Interactions of different urolithins with human serum albumin: Insights from fluorescence spectroscopy. In: *Proceedings of Serbian Biochemical Society. Twelfth Conference*. 21-23. September 2023. Belgrade, Serbia. pp 89-90.

2. Zelenović, N., Ostafe, R., Fischer R., Prodanović R. Directed evolution of cellulase from *Trichoderma reesei* for higher activity and development of microtiter plate assay based on cellobiose dehydrogenase. In: Proceedings of Serbian Biochemical Society. Seventh Conference. 10. November 2017. Belgrade, Serbia. pp 225-6.
 3. Zelenović, N., Ostafe, R., Fischer, R., Prodanović, R. Cellobiose dehydrogenase based screening system for directed evolution of cellulase from *Trichoderma reesei*. The Annual International Conference of the Romanian Society for Biochemistry & Molecular Biology. Timisoara, Romania. 8-9. jun 2017.
- **Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M60)**
1. Blazić, M., Kovačević, G., Zelenović, N., Ostafe, R., Gavrović-Jankulović, M., Fischer, R., Prodanović, R. Yeast surface display expression and purification of chimera glucose oxidase construct with Aga2 protein. Golden Jubilee Meeting of the Serbian Chemical Society. Belgrade, June, 2012.
 2. Stančić, A., Janković, A., Zelenović, N., Otašević, V., Vučetić, M., Buzadžić, B., Korać, A., Markelić, M., Veličković, K., Golić I, Korać. Uloga glutationa u regulaciji molekulske osnove remodeliranja skeletnih mišića na hladnoći. Prvi kongres - Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive. 24. septembar 2011, Beograd, Srbija, P 3, pp. 43, 2011.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Невена Д. Зеленовић**

Број индекса **ДБ09/2022**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање интеракција секундарних метаболита елагинске киселине (уролитина) са албуминима и екстрацелуларним везикулама

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, датум

Nevena Zelenović

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Невена Зеленовић**

Број индекса **ДБ16/2013**

Студијски програм **доктор биохемијских наука**

Наслов рада **Испитивање интеракција секундарних метаболита елагинске
киселине (уролитина) са албуминима екстрацелуларним
везикулама**

Ментори **др Милица Поповић и др Милица Којадиновић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, датум



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање интеракција секундарних метаболита елагинске киселине (уролитина) са албуминима и екстрацелуларним везикулама

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, датум



1. **Ауторство.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.