

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 12-16

11000 Београд, Србија

Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета

Предмет: Извештај Комисије за оцену докторске дисертације кандидата **Невене Д. Зеленовић**, мастер биохемичара, студента докторских академских студија Хемијског факултета, Универзитета у Београду.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној **10.04.2025.** године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени урађене докторске дисертације кандидата **Невене Д. Зеленовић**, мастер биохемичара, студента докторских академских студија Хемијског факултета, Универзитета у Београду, пријављене под насловом:

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

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној 21.4.2022. године на захтев Хемијског факултета (евиденциони број: 839/5 од 09.11.2023.) дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број: 61206-4215/2-23; 30.11.2023.).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација **Невене Д. Зеленовић** написана је на српском језику, на 118 страна, А4 формата (фонт Times New Roman величине 12 пт, проред 1.0 и маргинама 2 цм). Дисертација садржи 43 слике, 11 табела и 131 литературни податак и подељена је на 9 поглавља: **Увод** (3 стране), **Општи део** (27 страна), **Циљеви истраживања** (2 стране), **Материјал и методе** (10 страна), **Резултати** (35 страна), **Дискусија** (5 страна), **Закључци** (2 стране), **Литература** (12 страна), **Прилог** (5 страна). Поред наведеног дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику (2 стране), Страну са именима чланова комисије (1 страна), Захвалницу (1 страна), Сажетак на српском и енглеском језику (по 1 страна), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (2 стране), Биографију кандидата (1 страна), Библиографију кандидата (2 стране), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истовестности (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

Увод садржи актуелна истраживања која су од значаја за докторску дисертацију. Укратко су описане структура и биолошка активност уролитина (УРО). Објашњена је њихова

интеракција са серумским албуминима (СА) која утиче на транспорт и биодистрибуцију. Такође, разматра се потенцијал екстрацелуларних везикула (ЕВ) као носача УРО који могу побољшати њихову стабилност и циљану доставу.

Општи део обухвата седам целина. Прва целина, **Елагитанини и елагинска киселина**, описује изворе ових једињења, њихову структуру и биорасположивост. Друга целина, **Класе уролитина и метаботипови**, даје преглед настајања различитих УРО из елагинске киселине и описује метаботипове А, Б и 0. Трећа целина, **Механизми дејства уролитина А**, описује настанак УРО А у дебелом цреву дејством специфичних бактерија, апсорпцију и конјугацију у јетри при чему настају глукурониди и сулфати. Посебан фокус стављен је на његову улогу у митофагији, као и на његов антиоксидативни ефекат. Четврта целина је **Биолошка улога уролитина А** у различитим здравственим стањима. Приказан је његов утицај на старење, мишићну функцију, метаболичке поремећаје и инфламаторне болести, као и резултати *in vivo* и *in vitro* студија које показују његов потенцијал у лечењу различитих болести. Пета целина описује **Серумске албумине као носаче уролитина** у циркулацији. У овој целини је дат детаљан опис структуре и функције хуманог (*енгл.* human serum albumin, ХСА) и говеђег (*енгл.* bovine serum albumin, БСА) серумског албумина. Њихова структурна организација омогућава им да вежу широк спектар лиганата чинећи их једним од најважнијих транспортних протеина у плазми. Шеста целина, **Методe за проучавање протеин-лиганд интеракција**, описује спектроскопске методе (УВ/ВИС спектрофотометрија, флуоресцентна спектроскопија, синхрона флуоресцентна спектроскопија, инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (ФТ-ИР), циркуларни дихроизам (ЦД)) и рачунарске методе (молекулски докинг). Седма целина описује **системе за доставу биоактивних једињења**, са посебним фокусом на ЕВ као природне наносистеме. У овој целини су описане биолошка улога, терапијски потенцијал, методе изоловања ЕВ, као и методе инкорпорације УРО у ЕВ.

Поглавље **Циљеви** садржи основне циљеве ове докторске дисертације, као и неопходне кораке за остваривање датих циљева. Главни циљеви истраживања јесу испитивање природе интеракције УРО и њихових конјугата са БСА и ХСА, као и испитивање метода за инкорпорацију препарата УРО А у ЕВ из комерцијалних хуманих ћелијских линија.

Материјал и методе садрже детаљан опис опреме, реагенса, узорака, експерименталних метода и процедура коришћених током израде ове докторске дисертације.

У поглављу **Резултати** су детаљно изнети конкретни резултати истраживања добијени током израде ове докторске дисертације. Ово поглавље је подељено на 9 целина. У првој целини, **Гашење унутрашње флуоресценције серумских протеина уролитинима**, описани су резултати добијени методом флуоресцентне спектроскопије који показују гашење унутрашње флуоресценције БСА и ХСА у присуству УРО. Следећа целина, **Стерн-Волмеров дијаграми и константе код ХСА**, описује добијене дијаграме и константе који указују на мешовит механизам гашења флуоресценције ХСА у присуству УРО. Трећа целина по реду, **Константе везивања и број везивних места у ХСА**, пружа

информације о константама везивања које говоре о умереном афинитету УРО и броју везивних места за УРО на протеину. Целина **Термодинамички параметри ХСА-УРО комплекса** даје израчунате вредности промене енталпије (ΔH), промене ентропије (ΔS) и промене слободне Гибсове енергије (ΔG) које нам указују да је процес формирања датог комплекса термодинамички повољан. Пета целина, **Синхрони флуоресцентни спектри ХСА-УРО комплекса**, открива нам место везивања УРО за ХСА, односно да се некојуговани УРО повољно везују за Судлов I место. Шеста целина, **ФТ-ИР спектри ХСА-УРО комплекса**, показују очување најдоминантније секундарне структуре (α -хеликса) у ХСА молекулу. У целини, **ЦД спектри комплекса ХСА-УРО А**, анализирано је везивање УРО А за ХСА молекул ЦД спектроскопијом. Добијени резултати указују да се не нарушава секундарна структура ХСА и да је она остала претежно α -хеликсна. Осма целина, **Молекулски докинг серум албумина и уролитина**, је подељена на две подцелине: **Молекулски докинг БСА-УРО комплекса** и **Молекулски докинг ХСА-УРО комплекса**. Ова метода је предложила места везивања УРО и њихових конјугата за дате албумине и показала који типови интеракција се остварују између УРО и протеина. Девета целина, **Анализа УРО А изолованог из екстрацелуларних везикула**, даје резултат након инкорпорације и екстракције УРО А из екстрацелуларних везикула методом течне хроматографије са масеном спектрометријом (ЛЦ-МС).

Поглавље **Дискусија** коментарише, анализира и пореди добијене резултате са литературним подацима. Поређењем експерименталних резултата са подацима из литературе потврђују се почетне хипотезе.

У поглављу **Закључци** налазе се укратко сумирани добијени резултати, прокоментарисан њихов значај, као и одговори на питања формулисана у оквиру циљева ове дисертације.

У поглављу **Литература** наведени су радови из области истраживања који покривају све делове дисертације.

У **Прилогу** се налазе додатни резултати релевантни за ову докторску дисертацију.

Б. Кратак приказ резултата дисертације

У овој докторској дисертацији је испитивана природа интеракција УРО, секундарних метаболита елагинске киселине, са серумским албуминима. Интеркације слободних и конјугованих УРО су испитиване прво са БСА, као модел системом серумских албумина, методом флуоресцентне спектроскопије на 298 К и физиолошкој рН вредности. Добијени резултати показују да УРО узрокују гашење флуоресценције БСА у зависности од своје структуре. Агликони уролитина, УРО А и УРО Б, показују израженији ефекат на гашење флуоресценције БСА у односу на своје конјуговане облике. Подаци о гашењу флуоресценције БСА су анализирани Стерн-Волмеровим дијаграмима који предвиђају тип механизма гашења флуоресценције. Линеарни Стерн-Волмерови дијаграми су добијени за примењене концентрације УРО Б и конјуговане УРО АГ и УРО БГ и указују на присуство једног механизма гашења флуоресценције. За примењен концентрациони опсег УРО А, Стерн-Волмеров дијаграм није линеаран, што указује на комбинацију динамичког и

статичког механизма познатог као модел „сфере деловања”. Израчунате вредности Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) показује да је УРО А, за разлику од УРО Б и њихових конјугата УРО АГ и УРО БГ, реактивнији у гашењу БСА флуоресценције. Израчуната је и бимолекуларна константа гашења (K_q) чије су вредности веће од $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ што указује на присуство статичког механизма гашења флуоресценције БСА, односно настајања комплекса протеин-лиганд.

Поред БСА, интеракције УРО су испитане и са ХСА методом флуоресцентне спектроскопије на 298 К, 303 К и 310 К и физиолошкој рН вредности. Гашење флуоресценције ХСА на наведеним температурама са порастом концентрације УРО (од 3 до 10 μM , са инкрементом од 1 μM) се одвија без промене емисионог максимума λ_{em} или облика пика, што указује на очување локалне структуре флуорофора. Стерн-Волмерови дијаграми за све три испитиване температуре показују линеарност за коришћени опсег концентрација, што указује на статички механизам гашења. Међутим, постоји изражена промена нагиба праве са порастом температуре, што сугерише на комбинацију истовременог статичког и динамичког процеса гашења ХСА. Зато су подаци анализирани коришћењем модификованих верзија Стерн-Волмеровог дијаграма. Израчунате вредности константи везивања су у опсегу од 10^4 - 10^5 L mol^{-1} и означавају да УРО имају умерени афинитет везивања за ХСА. Добијене вредности броја везивних места ($n \approx 1$) потврђују присуство једног везивног места на протеину. Температурна зависност константе везивања УРО за ХСА је омогућила израчунавање термодинамичких параметара ΔH и ΔS . Њихове негативне вредности указују да у формирању ХСА-УРО комплекса преовлађују ван дер Валсове интеракције или водоничне везе. Негативне вредности ΔG указују да је реакција формирања овог комплекса егзергона и спонтана.

Синхрона флуоресцентна спектроскопија ХСА-УРО комплекса открила је да се некојуговани УРО повољно везују за Судлов I место. ФТ-ИР спектри унутар амидног III региона показују очување најдоминантније секундарне структуре, α -хеликса, што указује да примењене концентрације УРО нису изазвале значајно нарушавање нативне структуре ХСА. ЦД спектри показују да везивање УРО А за ХСА није довело до дестабилизације протеина и/или губитка специфичног хеликоидног аранжмана.

Студије молекулског докинга потврђују да се сви проучавани УРО повољно везују за БСА, првенствено за Судлов I место. Међутим, неконјуговани УРО ће се везивати и за Судлов II место када је прво место везивања попуњено. Конјугати УРО се поред Судлов I места, везују и за међудоменску шупљину БСА, само са нижим афинитетом везивања. Докинг студија везивања за ХСА показује да УРО А и УРО Б имају скоро једнак афинитет ка Судлов I месту и међудоменској шупљини. УРО Ц и УРО Д преферирају међудоменску шупљину. Међутим, докинг студија указује на то да је за конјуговане УРО међудоменска шупљина примарно место везивања на ХСА.

У овој дисертацији су испитиване и методе инкорпорације УРО А, представника класе уролитина, у ЕВ добијене из ХЕК 293 ћелије које су узгајане у ћелијском медијуму са антибиотцима и суплементом раста. Након замене кондиционираног медијума са медијумом који не садржи суплемент раста ћелија, долази до лучења ЕВ. Везикуле су пречишћене из медијума имуноафинитетном хроматографијом, базираној на имобилизацији пет антитела која имају само тешке ланце за метакрилатни полимер и окарактерисане НТА (*енгл.* Nanoparticle tracking analysis) методом чиме им је одређена концентрација протеина, величина честица и број партикула/мл. Изоловане ЕВ су методом пасивне дифузије пуњене са 100 μM УРО А. Након инкорпорације УРО А у ЕВ и његове екстракције из истих, одрађена је ЛЦ-МС како би се квантификовао узорак. Инкорпорација УРО А пасивном дифузијом у ЕВ је дала очекивано мали принос (1,6 μM).

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Уролитини чине метаболичку породицу која се производи у интестиналном тракту отварањем и декарбоксилацијом једног од лактонских прстена елагинске киселине и секвенцијалним уклањањем хидроксилне групе са различитих позиција [1]. Добијени уролитини су бензокумарини, липофилне природе, што им омогућава лак пролазак биолошких баријера и улазак у циркулацију. У плазми се уролитини налазе у виду конјугата са глукуронском киселином или сулфатима или се везују за серумске албумине како би се транспортовали до циљних ткива [1].

У стручној литератури готово да нема података о интеракцијима УРО са серумским албуминима. Зато су у оквиру ове докторске дисертације испитане инетракције које остварују како слободни тако и конјуговани УРО са БСА и ХСА спектроскопским методама и рачунарским техникама. БСА се у оваквим истраживањима користи због своје ниске цене, лаке доступности и високе структурне сличности са ХСА. Међутим, разлика се огледа у броју Trp остатака (БСА има два, док ХСА има само један) од којих потиче унутрашња флуоресценција. На основу те чињенице гашење флуоресценције се користи за мерење афинитета везивања [2,3].

У овој дисертацији резултати флуоресцентне спектроскопије показали су да БСА и ХСА везују УРО на шта указује смањење унутрашње флуоресценције датих протеина са повећањем концентрације УРО. Везивање УРО није променило емисиони максимум што указује да није дошло до промене микроокружења Trp остатка, односно нема значајнијих конформационих промена у структурама протеина. У стручној литератури је показано везивање елагинске киселине као прекурсора уролитина за БСА на рН 7,4 и 298 К флуоресцентном спектроскопијом и смањење унутрашње флуоресценције протеина без померања емисионог максимума [3]. Добијене вредности константи везивања испитиваних УРО за дате протеине износи 10^4 - 10^5 M^{-1} . Константе овог реда величине сугеришу на умерени афинитет везивања. Такође, у литератури су дате константе везивања елагинске киселине, прекурсора УРО, за БСА истог реда величине [3].

ХСА, поред Тгр остатка, поседује и Туг остатак који доприноси унутрашњој флуоресценцији протеина. Синхрона флуоресцентна спектроскопија је техника која се користи за анализу промена у микроокружењу Туг и Тгр у ХСА молекулу при интеракцијама са УРО [4]. Пошто УРО гаси флуоресценцију око Туг и Тгр остатака истовремено, синхрона флуоресцентна спектроскопија је открила да је Судлов I место примарно место везивања за неконјуговане уролитине. За конјуговане УРО синхрона флуоресцентна спектроскопија показала је јако малу промену у максимумима таласне дужине емисије Тгр и Туг остатака.

Флуоресцентни спектри су показали да нема померања емисионог максимума што указује да везивања УРО не нарушава локално окружење Тгр остатка ни код БСА ни код ХСА. Промене настале приликом везивања ових једињења се прате инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеровом трансформацијом (ФТ-ИР) и циркуларним дихроизмом (ЦД). За потребе посматрања промена у секундарној структури ХСА снимани су ФТ-ИР спектри унутар амидног III региона [5] који показују очување α -хеликсне структуре за примењене концентрације УРО. Ови резултати су додатно потврђени коришћењем УРО А као лиганда у ЦД спектроскопији. Далеки-УВ ЦД спектар (180-250 нм) ХСА показује два карактеристична минимума на 208 нм и 222 нм, који указују на присуство α -хеликсне структуре [6]. Везивање УРО А за протеин није довело до промена у секундарним структурама, што се може видети у ЦД спектрима.

Добијени резултати омогућили су боље разумевање механизма везивања уролитина за серумске албумине и њиховог транспорта кроз циркулацију. Ови резултати су употпуњени резултатима добијеним молекулским докинг, који је омогућио предвиђање афинитета везивања, идентификацију везних места и процену стабилности комплекса на молекуларном нивоу. Захваљујући напретку рачунарских метода и доступности структурних података, докинг је постао кључан алат у истраживању биолошких интеракција и рационалном дизајну лекова [7]. До сада нису спроведене молекулске докинг студије интеракције уролитина А, Б, Ц и Д, као ни њихових конјугованих облика, са серумским албуминима. У овој дисертацији се први пут систематски анализирају њихови механизми везивања, афинитети и типови интеракција. Докинг је показао да се сви слободни УРО везују за Судлов I место код БСА, али уколико је оно заузето могу се везати и за Судлов II место. Међутим, конјуговани облици, због своје робусностине могу стати у Судлов II место и зато преферирају међудоменску шупљину БСА. Код ХСА, слободни УРО А и УРО Б се везују за Судлов I место, док слободни УРО Ц и УРО Д преферирају међудоменску шупљину, што је и примарно место за њихове конјуговане облике.

Дисертација је показала да се УРО везују за серумске албумине како би се транспортовали до циљних ткива, где испољавају антиоксидативну, антигликативну, антиинфламаторну и антиканцерску активност. Најзаступљенији међу њима су УРО А и његов конјугат, што им омогућава најизраженију биолошку активност, посебно у стимулисању аутофагије у

дисфункционалним митохондријама. Овај процес је познат као митофагија. Пречишћени УРО А је због овог својства искоришћен за производњу суплемента (*енгл.* Mitopure) који повећава мишићну издржљивост [8].

У дисертацији је испитана метода инкорпорације УРО А, представника класе уролитина, у ЕВ добијене из комерцијалних хуманих ћелијских линија. Оне су погодни непротеински наноносачи због своје величине, структуре и могућности проласка биолошких баријера, док инкорпорација штити ова једињења од оксидације и конјугације у циркулацији [9]. У стручној литератури је показано да је успешно инкорпориран куркумин, биљни полифенол, у ЕВ из крављег млека користећи пасивну инкубацију, електропорацију и сонификацију. Као најпродуктивнија метода се показала пасивна инкубација са приносом од 2 μM за куркумин [10]. Резултати дисертације су показали да је инкорпорација УРО А методом пасивне дифузије у ЕВ добијених из ХЕК 293 ћелија могућа. Пасивна дифузија се показала као добра метода инкорпорације УРО А у ЕВ због своје једноставности и очувања интегритета мембранске структуре везикула и самог једињења. Принос екстрахованог УРО А из везикула утврђен је ЛЦ-МС методом и износи 1.6 μM . Међутим, због релативно малог приноса инкорпорираног УРО А, неопходна је оптимизација услова за инкорпорацију (температура, pH). Ови резултати истичу потенцијал ЕВ као носилаца УРО чиме се отвара могућност за прецизну и циљану доставу биоактивних једињења.

Литература:

1. Espín JC, Larrosa M, García-Conesa M, Tomás-Barberán F. (2013) Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013, 270418.
2. 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.
3. 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.
4. Miller, J. N. (1979). Recent advances in molecular luminescence analysis. *Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society*, 16, 203-208.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Singh A, D'Amico D, Andreux PA, et al. (2022) Direct supplementation with urolithin A overcomes limitations of dietary exposure and gut microbiome variability in healthy adults to achieve consistent levels across the population. *Eur J Clin Nutr*, 76(2),297-308.
9. 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.
10. 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.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су два научна рада од којих је један публикован у врхунском међународном часопису (категорија М21), а други у истакнутом међународном часопису (категорија М23). Такође, резултати су презентовани и на научном скупу - саопштења на међународном скупу штампана у изводу (категорија М34).

1. Врхунски међународни часопис

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>

(М21; IF 4,20; Категорија: Биохемија и молекуларна биологија: 85/285 у 2023. години).

2. Међународни часопис

Zelenović, N., Kojadinović, M., Filipović, 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>

(М23; IF 1,80; Категорија: Хемија, Медицина: 49/60 у 2022. години).

• Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (М30)

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.

Поред наведених публикација и саопштења која су проистекла из ове дисертације, кандидат је коаутор још три научна рада, од којих је један објављен у часопису М22 категорије и два у часопису М23 категорије. Такође, кандидат је коаутор два саопштења са међународних скупова штампана у изводу (М30 категорија) и два саопштења са националних скупова штампана у изводу (М60 категорија).

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност докторске дисертације **Невене Д. Зеленовић** је проверена употребом програма **iThenticate** на начин прописан Правилником о поступку провере

оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр.204/22.06.2018.). Утврђено је да је степен подударности од **9 %** настао као последица универзалних скраћеница, назива једињења, цитата, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом ове дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је прихватљиво у складу са чланом 9. овог Правилника.

Имајући све у виду, сматрамо да је докторска дисертација **Невене Д. Зеленовић** у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

На основу приказаних података и резултата Комисија је закључила да је у поднетој дисертацији под називом „**Испитивање интеракција секундарних метаболита елагинске киселине (уролитина) са албуминима и екстрацелуларним везикулама**“, кандидаткиња **Невена Д. Зеленовић** успешно одговорила на задате циљеве. Комисија је такође мишљења да је дисертација резултат самосталног истраживачког рада и да добијени резултати садрже научни допринос у области биохемије.

У овој дисертацији су први пут детаљно испитане интеракције уролитина и њихових конјугата са говеђим и хуманим серумским албуминима спектроскопским методама и молекулским докингом. Резултати су показали да оба протеина везују ове метаболите што потврђује смањење унутрашње флуоресценције датих протеина са повећањем концентрације УРО. Одсуство промене емисионог максимума флуоресцентних спектра ових протеина указује на очување структуре протеина. Стерн-Волмерове константе реда 10^4 M^{-1} указују на умерени афинитет везивања. Линеарност Стерн-Волмерових дијаграма за УРО Б, УРО АГ и УРО БГ сугерише статички механизам гашења флуоресценције БСА, док одступање од линеарности код УРО А указује на мешовити механизам. Код ХСА, сви испитани УРО гасе флуоресценцију мешовитим механизмом. Испитивање везивања УРО на три температуре је показало да ХСА има једно везивно место за ове лиганде. Негативне вредности промене Гибсове слободне енергије на свим испитаним температурама показује да је процес формирања ХСА-УРО комплекса термодинамички повољан. Међутим, процес везивања је мање повољан на вишим температурама. Конјугација УРО са глукуронидима смањује њихов афинитет и ка БСА и ка ХСА протеину. Анализе ФТИР и ЦД спектра указују да не долази до промене у структури ХСА молекула приликом везивања УРО. Молекулски докинг је показао да се УРО А и УРО Б везују за Судлов I место у молекулима БСА и ХСА молекула, док УРО Ц и УРО Д преферирају међудоменску шупљину ХСА

молекула. Такође је установљено да се слободни УРО могу везати и за Судлов II место присутно у серумским албуминима. Међутим, конјуговани УРО се везују и за међудоменску шупљину ових протеина. Добијени резултати нам омогућавају да боље разумемо механизам везивања и транспорта односно фармакодинамику ових биолошки активних једињења. УРО А је као представник уролитина коришћен за испитивање паковања у екстрацелуларне везикуле добијене из ХЕК 293 ћелија методом пасивне дифузије. Принос екстрахованог УРО А из ЕВ је утврђен методом ЛЦ-МС и износи 1.6 μM .

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације до сада су објављени у оквиру два научна рада штампана у међународним научним часописима из категорије M21 и M23, као и саопштења представљеног на скупу међународног значаја штампаног у изводу.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да прихвати поднету докторску дисертацију **Невене Д. Зеленовић**, мастер биохемичара под насловом „**Испитивање интеракција секундарних метаболита елагинске киселине (уролитина) са албуминима и екстрацелуларним везикулама**“ за стицање звања доктора биохемијских наука, као и да одобри њену јавну одбрану.

У Београду, 11.04.2025.

КОМИСИЈА

др Наталија Половић, редовни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет,

др Радивоје Продановић, редовни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет,

др Бојан Бонцић, научни саветник
Универзитет у Београду- Институт за хемију, технологију и металургију-
Институт од националног значаја за Републику Србију