

**Nastavno-naučnom veću
Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta održanoj 12. februara 2015. godine određeni smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije Ivana Pavićevića, mastera biohemičara, pod nazivom: „**Promene reaktivnosti tiolne grupe Cys34 humanog serum-albumina pri vezivanju masnih kiselina *in vitro* i u karbonilnom stresu**”. Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta sledeći:

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Ivana Pavićevića, napisana je na 129 strana A4 formata (prored 1.5) i sadrži 48 slike i 12 tabela. Rad obuhvata sledeća poglavlja: Uvod (3 strane), Pregled literature (29 strana), Materijal i metode (19 strana), Rezultati i diskusija (57 strana), Zaključak (5 strane) i Literatura (16 strana, 151 citat). Pored navedenog, disertacija sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku (po četiri strane), Listu skraćenica i akronima, Sadržaj i Biografiju kandidata.

U **Uvodu** je opisan predmet istraživanja i istaknuti su ciljevi doktorske disertacije: 1) *in vitro* ispitivanje uticaja vezivanja masnih kiselina (MK) na: reaktivnost tiolne grupe Cys34 ostatka humanog serum-albumina (HSA), (ii) potencijal tiolne grupe kao hvatača reaktivnih α -oksoaldehida i (iii) reaktivnost tiolne grupe karbonilovanog HSA; 2) ispitivanje uticaja vezivanja MK ribljeg ulja na reaktivnost Cys34 tiolne grupe; 3) određivanje sadržaja slobodne HSA-SH grupe, i njegova korelacija sa sadržajem HbA1c i glukoze kod osoba sa karbonilnim stresom i u kontrolnoj grupi; 4) određivanje reaktivnosti tiolne grupe HSA izolovanog iz seruma dijabetičara (kod kojih je povećan sadržaj MK i reaktivnih karbonilnih vrsta, odnosno glikacija/karbonilacija proteina) i kontrolne grupe; 5) razvijanje qTLC metode za određivanje sadržaja MK, vezanih za HSA, koji je izolovan iz realnih uzoraka.

Pregled literature obuhvata osam celina. Najpre je opisana biosinteza, razgradnja i fiziološka uloga HSA, zatim sledi prikaz strukture molekula HSA. Vezivna mesta (na N-terminusu, subdomenima I, II, i III, centralnom interdomenskom procepu) i ligandi koji se vezuju za HSA prikazani su u trećoj celini. Poglavlje 4 bavi se MK u cirkulaciji i patofiziološkim stanjima u kojima je povišen nivo slobodnih MK, a u poglavlju 5 dat je detaljan opis mesta vezivanja MK na molekulu HSA. Sledi celina sa prikazom reaktivnosti Cys34-SH grupe, a zatim odeljak koji se bavi α -oksoaldehidima, glikacijom/karbonilacijom HSA, i patološkim stanjima u kojima je karbonilacija HSA povećana. U poglavlju 8 dat je pregled metoda za određivanje sadržaja MK.

Materijali i metode sadrže detaljan opis eksperimentalnih procedura i metoda primenjenih u okviru doktorske disertacije.

U poglavlju **Rezultati i diskusija** kandidat je dobijene rezultate prikazao u okviru pet celina. U prvoj celini prikazani su podaci o stepenu izloženosti pojedinačnih aminokiselinskih ostataka molekula HSA (bez i sa vezanim MK) rastvaraču, dobijeni računski primenom online programa ASAView, kao i eksperimentalni rezultati o dostupnosti tiolne grupe HSA, odmašćenog i u kompleksu sa MK, za

reakciju oksidacije/karbonilacije. U drugoj celini prikazani su i diskutovani rezultati *in vitro* ispitivanja uticaja vezivanja MK, različite dužine lanca i zasićenosti (miristinske, C14:0 (MYR); palmitinske, C16:0 (PLM); stearinske (STE), C18:0; oleinske, C18:1 (OLA); izolovane i prečišćene eikozapentaenske, C20:5 (EPA) i dokozaheksaenske kiseline, C22:6 (DHA) iz preparata ribljeg ulja) za HSA u odnosu 4:1, na reaktivnost tiolne grupe ostatka Cys34 (kinetiku reakcije tiolne grupe sa Elmanovim reagensom), odnosno na promenu konformacije HSA i time na dostupnost/izloženost tiolne grupe. Razmatrana je mogućnost modulacije reaktivnosti/tiolnog kapaciteta HSA Cys34 ostatka, unošenjem određenih MK kao suplemenata ishrani. Rezultati *in vitro* ispitivanja potencijala tiolne grupe kompleksa HSA sa različitim MK kao hvatača reaktivnih α -oksoaldehida (metilglioksala, MG), odnosno stepena karbonilacije tiolne grupe prikazani su i diskutovani u trećoj celini. Takođe je prikazano kako se reaktivnost Cys34 ostatka menja pri vezivanju slobodnih MK za karbonilovani HSA (model-sistem za molekule HSA modifikovane u karbonilnom stresu). Za ispitivanje reaktivnosti tiolne grupe HSA izolovanog iz realnih uzoraka, razvijena je metoda pogodna za određivanje sadržaja MK vezanih za HSA. Rezultati optimizacije uslova za ekstrakciju MK i određivanje qTLC metodom prikazani su u četvrtoj celini. Rezultati određivanja sadržaja Cys34-SH grupe u realnim uzorcima, serumima obolelih od dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma, i u kontrolnoj grupi, i njegoa korelacija sa sadržajem glukoze i HbA1c prikazani su i prodiskutovani u poslednjoj celini, kao i rezultati ispitivanja promena reaktivnosti Cys34-SH grupe u uslovima povećane karbonilacije proteina.

U **Zaključku** kandidat je sumirao dobijene rezultate, a u poglavlju **Literatura** navedeni su ključni radovi iz oblasti koje disertacija obuhvata.

B. Kratak prikaz rezultata

Ispitivanje uticaja vezivanja MK (različite dužine lanca i zasićenosti) za HSA *in vitro*, na reaktivnost tiolne grupe ostatka Cys34 (kinetiku reakcije tiolne grupe sa Elmanovim reagensom) pokazalo je da su vrednosti konstanti brzine reakcije pseudo-prvog reda (k) tiolne grupe Cys34 (od $14,5 \pm 0,19 \times 10^{-3}$ do $26,02 \pm 1,06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), odnosno njena reaktivnost, za 2 do 3,5 puta veće u odnosu na k odmašćenog HSA ($7,52 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). STE i OLA ispoljavaju slične efekte na reaktivnost HSA-SH (k vrednosti iznose $17,34 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ i $16,97 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom), a najjači efekat ispoljava polinezasićena EPA ($k=26,02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Od zasićenih MK, najveća vrednost k dobijena je pri vezivanju MYR za HSA ($17,77 \pm 0,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), što može biti posledica izuzetne komplementarnosti njenog molekula sa vezivnim mestima na molekulu HSA, koja najviše utiču na izloženost tiolne grupe rastvaraču. Između vrednosti konstanti brzine reakcije Cys34 tiolne grupe, dobijenih pri vezivanju različitih MK, i vrednosti izloženosti/dostupnosti Cys34 tiolne grupe rastvaraču nađen je visok stepen korelacije ($r=0,927$). To ukazuje da je reaktivnost tiolne grupe ostatka Cys34 povezana sa promenom konformacije molekula HSA pri vezivanju MK, što je dokazano i snimanjem fluorescentnih spektara HSA-MK kompleksa. Promena konformacije molekula HSA zavisi od tipa (dužine ugljovodoničnog niza i stepena nezasićenosti) i broja molekula MK vezanih za HSA.

Vrednost konstante brzine reakcije Cys34 tiolne grupe kompleksa HSA-MK ribljeg ulja ($17,17 \pm 0,35 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) je 2,4 puta veća u odnosu na k odmašćenog HSA, i nalazi se između vrednosti dobijenih za komplekse HSA-OLA i HSA-DHA. Polazeći od zastupljenosti MK u ribljem ulju (37%

EPA, 32% DHA, 8% OLA, određene GC metodom), i pretpostavljajući da je doprinos prosečnoj kinetičkoj konstanti aditivan, računski dobijena vrednost za kinetičku konstantu iznosi $16,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, što se dobro slaže sa eksperimentalno određenom vrednošću.

Vezivanje MK (zasićenih, mono- i polinezasićenih) za HSA utiče i na potencijal tiolne grupe ostatka Cys34 kao hvatača reaktivnih α -oksoaldehida, koji se generišu u karbonilnom stresu. Pri karbonilaciji HSA sa MG *in vitro* tiolna grupa u kompleksima HSA-zasićene MK i HSA-OLA karbonilovana je u većem stepenu (od 53 do 65%) u odnosu na tiolnu grupu odmašćenog HSA (45%). U slučaju kompleksa HSA sa polinezasićenim MK dugog niza, HSA-EPA i HSA-DHA, kao i kompleksa sa MK izolovanim iz ribljeg ulja, dolazi do brzog i izrazitog pada sadržaja HSA-SH, tako da je određivanje stepena karbonilacije otežano. Kapacitet HSA-SH grupe kao hvatača metilglioksala raste pri vezivanju MK, a porast zavisi od vrste MK vezane za HSA.

Ispitivanje uticaja vezivanja MK na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA, koji je prethodno karbonilovan (MG-HSA, model-sistem za molekule HSA modifikovane u karbonilnom stresu, kao što je slučaj u dijabetesu), pokazalo je da MYR, PAL, STE i OLA dovode do povećanja reaktivnosti ove grupe (vrednosti: od $9,84$ do $13,80 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) u odnosu na odmašćeni karbonilovani MG-HSA ($7,74 \pm 0,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), ali da je ono manje izraženo u odnosu na nekarbonilovane HSA-MK komplekse. Ovo može biti posledica dodatnih promena konformacije HSA molekula tokom reakcije karbonilacije amino- i gvuanidino-grupa ostataka amino-kiselina metilglioksalom, što je potvrđeno: (1) PAG elektroforezom i spektrofluorimetrijskim merenjima i (2) izostankom odstupanja, dobijenog pri ispitivanju reaktivnosti tiolne grupe posle vezivanja MK različite dužine lanca za HSA ($k_{\text{HSA-MYR}}=17,77 \pm 0,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ vs. $k_{\text{HSA-PLM}}=14,58 \pm 0,19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), pri njihovom vezivanju za karbonilovani MG-HSA. Povećanje vrednosti konstante brzine reakcije korelira sa povećanjem dužine ugljovodoničnog niza MK u seriji MYR, PLM i STE. Vrednosti konstanti brzine reakcije, koje su dobijene za slobodnu SH-grupu kompleksa MG-HSA-STE i MG-HSA-OLA gotovo su jednake.

Uticaj vezanih MK na potencijal Cys34 tiolne grupe kao „hvatača“, kod osoba sa karbonilnim stresom (n=16), ispitan je određivanjem sadržaja Cys34 tiolne grupe, MK vezanih za HSA, glukoze, HbA1c i reaktivnosti tiolne grupe, i njihovim poređenjem sa kontrolnom grupom (n=7). Sadržaji MK ($2,46 \pm 0,42 \text{ mol MK/molHSA}$), glukoze ($10,4 \pm 4,3 \text{ mmol/L}$) i HbA1c ($9,2 \pm 2,1\%$) su statistički ($p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,001$, redom) značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu ($0,76 \pm 0,37 \text{ mol MK/molHSA}$; $5,2 \pm 0,3 \text{ mmol/L}$; $5,1 \pm 0,4\%$, redom). Između sadržaja tiolne grupe i glukoze, kao i HbA1c nađena je slaba korelacija ($r=0,560$ i $0,415$, redom). Srednja vrednost konstante brzine reakcije Cys34 tiolne grupe HSA izolovanog iz seruma dijabetičara ($11,19 \pm 1,16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) je statistički ($p < 0,001$) značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu ($6,93 \pm 0,41 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), što je povezano sa povećanim sadržajem MK ($1,25 \pm 0,27 \text{ mmol/L}$) i triglicerida ($2,2 \pm 1,3 \text{ mmol/L}$) u serumu obolelih (u odnosu na kontrolu: $0,39 \pm 0,19 \text{ mmol/L}$, $1,1 \pm 0,3 \text{ mmol/L}$, redom). Između konstanti brzine i odnosa MK/HSA, kod obolelih je dobijena visoka korelacija ($\rho=0,837$), i nešto niža u kontrolnoj grupi ($\rho=0,400$).

U cilju procene uticaja MK, vezanih za HSA u realnim uzorcima, na reaktivnost Cys34 tiolne grupe razvijena je metoda za određivanje sadržaja vezanih MK. Optimizovani su uslovi za izolovanje i ekstrakciju MK iz HSA izolovanog iz seruma taloženjem sa amonijum-sulfatom, i za kvantifikaciju MK pomoću qTLC. Razvijeno je specifično softversko rešenje u statističkom okruženju R, koje omogućava denzitometrijsku analizu skenirane TLC pločice. Metoda je precizna (RSD vrednosti: od

1,4 do 4,7 %) i tačna (rikaveri vrednosti od 97,2 do 102,5 %, slaganje vrednosti sadržaja MK određenih pomoću qTLC i GC), potrebna je znatno manja količina uzorka, kraće vreme za izvođenje analize, manje je tehnički zahtevna i jeftina, i zato pogodna za rutinski rad u kliničkim laboratorijama.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

HSA je najzastupljeniji protein plazme sa udelom od oko 50 do 60 % svih proteina plazme. Vezuje i transportuje mnoge endogene i egzogene molekule. Pri normalnim fiziološkim uslovima HSA vezuje od 0,1 do 2 mol MK/mol HSA. Za vreme gladovanja, ekstremnog vežbanja i u nekim patološkim stanjima (kao što su dijabetes, bolesti jetre i kardiovaskularne bolesti) nađeno je da molarni odnos MK/HSA može rasti i do 6:1. Molekul HSA poseduje sedam dobro definisanih mesta za vezivanje MK srednjeg i dugog lanca, pri čemu se afiniteti mesta dosta razlikuju. Pored transportne uloge, HSA doprinosi antioksidativnom kapacitetu seruma, zajedno sa malim tiolima (kao što su Cys, GSH, koji su hvatači kiseoničnih i karbonilnih vrsta tokom oksidativnog i karbonilnog stresa), jer poseduje jednu slobodnu tiolnu grupu ostatka Cys34 na površini molekula HSA, koja je zaklonjena u okviru hidrofobnog džepa dubine 9,5 Å. Pokazano je da vezivanje MK za HSA dovodi do promene kinetike reakcije tiolne grupe sa vodonik-peroksidom i peroksi-nitritom. Ranija kristalografska ispitivanja, kao i računski razmatranja i eksperimentalna ispitivanja u okviru ove teze su pokazala da pri vezivanju MK dolazi do promena tercijarne strukture molekula HSA. Rezultati ove teze su, takođe, pokazali da to za posledicu ima promenu lokalne strukture oko Cys34 ostatka, promenu izloženosti/dostupnosti Cys34 tiolne grupe rastvaraču i promenu njene reaktivnosti (vrednosti konstanti brzine reakcije). Stepenu promena zavisi od tipa i broja molekula MK vezanih za HSA. Saznanje da reaktivnost HSA-Cys34 tiolne grupe zavisi od tipa vezane MK otvara mogućnost modulacije njene reaktivnosti, odnosno kapaciteta kao antioksidanta i hvatača reaktivnih vrsta, unošenjem određenih MK kao suplemenata ishrani. Pokazano je, takođe, da polazeći od vrste i zastupljenosti MK u preparatu ribljeg ulja, i od određenih k vrednosti tiolne grupe kompleksa HSA-MK, može se predvideti doprinos ribljeg ulja antioksidativnom potencijalu Cys34-SH grupe.

Veliki broj radova se u proteklom dekadama bavio karbonilacijom proteina α -oksoaldehydima u patološkim stanjima okarakterisanim karbonilnim stresom. Razmatrana je njihova reakcija sa amino- i guanidino-grupama ostataka lizina i arginina, ali i sa Cys34-SH grupom, i doprinos stvaranju AGEs, umrežavanju proteina (razvoju mikro- i makro-vaskularnih komplikacija), i potencijal ovih modifikacija kao markera patoloških stanja. Posledica ovih reakcija je promena tercijarne strukture proteina, odnosno njihove aktivnosti i funkcije. Iako je ranije navedeno da vezivanje MK za HSA može dovesti do promena redoks-svojstva tiolne grupe i njenog sulfenskog derivata, promene njene reaktivnosti prema karbonilnim jedinjenjima, odnosno promene potencijala kao „hvatača“ α -oksoaldehyda u složenom sistemu, u kome je vezivanje slobodnih MK za HSA povećano, do sada nisu istraživane. Stoga je u ovoj tezi ispitan uticaj vezivanja MK za HSA, koji je *in vitro* karbonilovan metilglioksalom (MG-HSA), na (ii) potencijal tiolne grupe kao hvatača reaktivnih α -oksoaldehyda, odnosno na stepen karbonilacije, i (iii) na reaktivnost tiolne grupe. MG je izabran zbog njegove velike reaktivnosti, stvaranja u značajnim količinama (u Maillard-ovim reakcijama i lipidnoj peroksidaciji, pri spontanom razlaganju gliceraldehyd-3-fosfata i dihidroksiaceton-fosfata, pri autooksidaciji ugljenih

hidrata i degradaciji glukoze) u dijabetesu. Nađeno je da se tiolna grupa u kompleksima HSA-zasićene MK i HSA-OLA karboniluje u većem stepenu u odnosu na tiolnu grupu odmašćenog HSA. Kapacitet HSA-SH grupe kao hvatača MG raste pri vezivanju MK, a porast zavisi od vrste MK vezane za HSA. Uticaj vezivanja MK na povećanje reaktivnosti Cys34 tiolne grupe MG-HSA je manje izražen u odnosu na nekarbonilovane HSA-MK komplekse, što je posledica dodatnih promena konformacije HSA molekula tokom reakcije karbonilacije amino- i gvuanidino-grupa metilglioksalom. Uprkos činjenici da je koncentracija MG (10 mmol/L), upotrebljena za karbonilaciju HSA *in vitro*, bila mnogo veća od njegove koncentracije pri normalnim fiziološkim uslovima i u dijabetesu (120 μ mol/L; 5–6 puta više vrednosti, redom), karbonilovani molekuli HSA još uvek imaju značajan potencijal kao hvatači MG, odnosno vezivanje MK dovodi do povećanja reaktivnosti njihove Cys34 tiolne grupe. Pored toga, kako je HSA najzastupljeniji protein u plazmi, Cys34-SH doprinosi značajno antioksidativnom potencijalu plazme, jer učestvuje sa oko 80 % u ukupnoj koncentraciji tiola u plazmi. Stoga, smanjenje njene reaktivnosti u MG-HSA-MK kompleksima, u poređenju sa HSA-MK kompleksima (nemodifikovani HSA), može uticati i na njen antioksidativni kapacitet.

Uticaj vezanih MK na potencijal HSA Cys34 tiolne grupe kao „hvatača“ reaktivnih vrsta u realnim uzorcima seruma, ispitana je kod osoba obolelih od dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma, osoba sa utvrđenom povećanom glikacijom proteina, karbonilnim stresom i hiperlipidemijom. Po prvi put je pokazano da je povećanje reaktivnosti Cys34 tiolne grupe HSA izolovanog iz njihovih seruma, u odnosu na kontrolnu grupu, povezano sa povećanim sadržajem MK vezanih za HSA. Promene reaktivnosti tiolne grupe u ovim uslovima mogu uticati na dugoročne efekte hiperglikemije u ovom patološkom stanju. Dobijeni rezultati imaju važne implikacije na mogućnost modulacije reaktivnosti/antioksidativnih svojstava tiolne grupe pomoću MK kao suplemenata.

Da bi se sa sigurnošću mogao proceniti uticaj MK vezanih za HSA, u serumima osoba sa hiperlipidemijom i karbonilnim stresom, na reaktivnost Cys34 tiolne grupe neophodno je odrediti sadržaj MK posle izolovanja HSA. GC analiza je nezamenljiva u ispitivanju profila MK u različitim uzorcima, ali za svakodnevno određivanje ukupnog sadržaja MK neophodna je jeftinija, vremenski manje zahtevna metoda, za koju je potrebna manja zapremina uzorka. Ove kriterijume zadovoljava nekoliko spektrofotometrijskih metoda, opisanih u literaturi, zasnovanih na građenju soli MK sa jonima prelaznih metala (često bakra i kobalta) u vodenoj fazi, njihovoj ekstrakciji hloroformom, zatim kompleksiranju jona prelaznih metala odgovarajućim reagensom da se nagradi bojeni proizvod, i potom merenju apsorbance na određenoj talanoj dužini. Niti jedna od ovih metoda nije dala zadovoljavajuće rezultate pri određivanju sadržaja MK vezanih za HSA, verovatno zbog interakcija jona metala sa HSA i sa komponentama pufera, kao i zbog nanomolskih količina MK, koje su ispod njihovih limita detekcije. qTLC metoda, razvijena u okviru ove teze, je precizna, tačna, zahteva znatno manju količinu uzorka, kraće vreme za izvođenje analize, manje je tehnički zahtevna i stoga jeftina. Pogodna je za rutinski rad u kliničkim laboratorijama. Može se primeniti za određivanje molskog odnosa MK/HSA, kao parametra u dijagnostici/proceni faktora rizika kod patoloških stanja kao što su metabolički sindrom, dijabetes, različite aritmije i druge kardiovaskularne promene, kod kojih odnos MK/HSA može da bude i iznad 6:1. Metoda može biti alternativna metodi za procenu sadržaja IMA (ishemijom modifikovanog albumina), ranog markera ishemije miokarda, koja se zasniva na vezivanju jona kobalta za albumin, na koje može uticati vezivanje MK za HSA. Dodatno, u skladu sa dobijenim

rezultatima da MK vezane za HSA modifikuju kinetiku reakcije slobodne Cys34 tiolne grupe, određivanje odnosa MK/HSA je značajno u evaluaciji procene antioksidativnog potencijala/oskidativnog stresa na osnovu sadržaja tiolne grupe Cys34 ostatka HSA molekula, koji je predložen kao marker istog.

D. Objavljeni radovi i saopštenja koja čine deo disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M21)

1. **I.D. Pavićević**, V.B. Jovanović, M.M. Takić, A.Z. Penezić-Romanjuk, J.M. Aćimović, Lj.M. Mandić. Fatty acids binding to human serum albumin: changes of reactivity and glycation level of Cysteine-34 free thiol group with methylglyoxal. *Chemico-Biological Interactions* 224C, 42–50 (2014) (IF 2,967 za 2012, Kategorija Pharmacology & Pharmacy 75/261)
2. **Ivan D. Pavićević**, Vesna B. Jovanović, Marija M. Takić, Jelena M. Aćimović, Ana Z. Penezić, Ljuba M. Mandić. Quantification of total content of non-esterified fatty acids bound to human serum albumin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2016) (IF 3.255 za 2016, Kategorija Chemistry, Analytical 18/76)

Saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

1. **Ivan D. Pavićević**, Ana Z. Penezić Romanjuk, Vesna B. Jovanović, Jelena M. Aćimović, Ljuba M. Mandić. (2013) Kinetic characterization of Cys34 thiol group of human serum albumin loaded with different long chain free fatty acids. *ICOSECS 8, Book of Abstracts*, pp 214
2. **Ivan D. Pavićević**, Vesna D. Jovanović, Jelena M. Aćimović, Ljuba M. Mandić. (2011) Impact of fatty acids binding to human serum albumin on the reaction of free thiol group of albumin, 2nd FCUB ERA workshop, food chemistry and biotechnology, *Book of Abstracts*, pp 43

Saopštenja na skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. **Ivan D. Pavićević**, Vesna B. Jovanović, Marija M. Takić, Jelena M. Aćimović, Ljuba M. Mandić. Kvantifikacija masnih kiselina vezanih za humani serum albumin, 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd 2015, *Izvodi radova* 92.
2. **Ivan D. Pavićević**, Vesna B. Jovanović, Marija M. Takić, Ana Z. Penezić, Jelena M. Aćimović, Ljuba M. Mandić. Fatty acids change the reactivity of the human serum albumin Cys34 thiol group. *Serbian Biochemical Society, Fifth Conference, Belgrade, 2015, Proceedings* p. 121

Ostali radovi

1. **Ivan D. Pavićević**. qtlc: Densitometric Analysis of Thin-Layer Chromatography Plates. R package version 1.0. (2016) <http://CRAN.R-project.org/package=qtlc>

E. Zaključak

Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji Ivan Pavićević uspešno ostvario postavljene ciljeve i odgovorio na postavljene zadatke. Naučni doprinos ove disertacije ogleda se u karakterizaciji promena na molekulu humanog serum-albumina, do kojih dolazi usled vezivanja masnih kiselina različite dužine lanca i zasićenosti (*in vitro* i *in vivo*), i koje za posledicu imaju povećanje dostupnosti/izloženosti rastvaraču, reaktivnosti i stepena karbonilacije slobodne tiolne grupe ostatka Cys34. Dobijeni rezultati imaju značajne implikacije u predviđanju kapaciteta humanog serum-albumina kao antioksidanta i kao hvatača reaktivnih vrsta, i otvaraju mogućnosti moduliranja kapaciteta unošenjem određenih masnih kiselina kao suplemenata ishrani. Dodatni doprinos ogleda se u optimizaciji precizne i tačne qTLC metode za određivanje sadržaja masnih kiselina vezanih za HSA (odnosno molskog odnosa MK/HSA), koja je jeftina, zahteva malu količinu uzorka, kratko vreme za izvođenje analize, i zato je pogodna za rutinski rad u kliničkoj praksi.

Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije, objavljeni u dva rada štampana u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M₂₁, četiri saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima, i jednom softverskom rešenju koje omogućava denzitometrijsku analizu, imaju fundamentalni biohemijski i biomedicinski značaj.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da podnetu doktorsku disertaciju Ivana Pavićevića pod naslovom „**Promene reaktivnosti tiolne grupe Cys34 humanog serum-albumina pri vezivanju masnih kiselina *in vitro* i u karbonilnom stresu**” prihvati i odobri njenu odbranu za sticanje akademskog zvanja doktora biohemijskih nauka.

U Beogradu, 28.07.2017.

Komisija:

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Miroslav Vrvić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Dimitrijević-Srećković, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu