

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.04.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Марије Глибетић и др Драгана Миленковића о урађеној докторској дисертацији **Ирене С. Крге**, истраживача приправника Центра изузетне вредности у области истраживања исхране и метаболизма, Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, под насловом „Утицај антоцијана и њихових метаболита на функцију ендотелних ћелија и тромбоцита човека *in vitro*“ ("Effects of anthocyanins and their metabolites on the function of human endothelial cells and platelets *in vitro*"). На истој седници одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Марија Глибетић, научни саветник, Центар изузетне вредности у области истраживања исхране и метаболизма, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду, др Тања Јевђовић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Љуба Мандић, редован професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, др Драган Миленковић, научни саветник, Национални институт за агрономска истраживања, Универзитет Клермон Оверња, Француска, др Колд Бодуан (Claude Beaudoin), редован професор, Универзитет Клермон Оверња, Француска, др Софи Леје (Sophie Layé), научни саветник, Национални институт за агрономска истраживања, Универзитет у Бордоу, Француска.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Ирене С. Крге** под насловом „Утицај антоцијана и њихових метаболита на функцију ендотелних ћелија и тромбоцита човека *in vitro*“ ("Effects of anthocyanins and their metabolites on the function of human endothelial cells and platelets *in vitro*"), израђена је кроз заједничко менторство у складу са Међународним споразумом о заједничком менторству при изради докторске дисертације („Котутела“), закљученим између Универзитета у Београду у Србији и Универзитета Клермон Оверња у Француској. Експериментални део ове дисертације урађен је у Центру изузетне вредности у области истраживања исхране и метаболизма при Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду у Србији и Националном институту за Агрономска истраживања (ИНРА), Клермон Феран/Те у Француској.

Докторска дисертација је написана на енглеском језику на 154 стране. Дисертација садржи: Насловну страну на енглеском, српском и француском језику, Податке о члановима комисије за одбрану дисертације, Захвалницу, Резиме на енглеском, српском и француском језику са кључним речима, Списак скраћеница, Списак табела и слика, Садржај и Текст по поглављима. Текст дисертације подељен је у 8 поглавља: Увод (35 страна), Циљ дисертације (1 страна), Материјал и методе (27 страна), Резултати (30

страна), Дискусија (15 страна), Закључци (3 стране), Литература (23 стране) и Прилози (20 страна). У оквиру дисертације се налази 20 табела и 43 слика и цитирано је 328 библиографских јединица. На крају дисертације приложени су: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

Увод докторске дисертације подељен је у три целине и садржи детаљан приказ досадашњих сазнања о кардиоваскуларним болестима и улози антоцијана у њиховој превенцији. Поглавље започиње класификацијом кардиоваскуларних болести, њиховом епидемиологијом и факторима ризика, као и описом атеросклерозе, хроничног запаљенског обољења артеријских крвних судова, која представља основни узрок настанка кардиоваскуларних болести. Посебна пажња посвећена је поремећају функције ендотела крвног суда, односно адхезији леукоцита за активирани ендотелне ћелије и њиховој трансендотелијалној миграцији, као процеса који представљају почетне кораке у настанку атеросклерозе. Осим тога, представљена је и улога тромбоцита у патогенези атеросклерозе, која се заснива на интеракцији активираних тромбоцита са леукоцитима и ендотелним ћелијама, и истакнут је значај истраживања, како ендотелних ћелија, тако и тромбоцита, у циљу превенције и контроле кардиоваскуларних болести. У другој целини поглавља описана је улога исхране у очувању кардиоваскуларног здравља. Приказана је повезаност исхране богате воћем и поврћем са смањењем ризика од настанака кардиоваскуларних болести, а посебно су обрађени полифеноли, секундарни метаболити биљака, највећим делом заслужни за повољно деловање намирница биљног порекла у превенцији кардиоваскуларних болести. Трећи одељак увода посвећен је антоцијанима, групи полифенолних једињења која представљају предмет изучавања ове докторске дисертације. Одељак приказује хемијску структуру, физичко-хемијске особине антоцијана, дијетарне изворе и унос, те њихову апсорпцију, дистрибуцију, метаболизам и екскрецију из људског организма, са акцентом на форме и концентрације једињења које се јављају у циркулацији након дијетарног уноса, а које могу испољити биолошки ефекат. Поред овога, дат је детаљан приказ досадашњих сазнања из епидемиолошких, клиничких и анималних студија о позитивном дејству антоцијана на кардиоваскуларно здравље. Приказани су и потенцијални молекуларни механизми њиховог кардиопротективног деловања, попут модулације експресије гена, активације сигналних путева и експресије микро-РНК. Дата је критичка анализа досадашњих *in vitro* студија, а као главни недостаци истакнути су њихов физиолошки ирелевантан дизајн и употреба метода које не дозвољавају изучавање предложеног плејотропног дејства антоцијана. Указано је и на недовољан број студија које испитују утицај антоцијана на функцију тромбоцита, и дате су препоруке за будућа истраживања, у циљу добијања релевантних података о механизмима деловања ових једињења.

У поглављу **Циљ дисертације**, на основу података изнесених у уводном делу, јасно су дефинисани циљ и непосредни задаци истраживања. Циљ докторске дисертације подразумевао је испитивање утицаја антоцијана и њихових метаболита на функцију ендотелних ћелија и тромбоцита као и идентификацију механизма њиховог деловања у физиолошки релевантним *in vitro* експерименталним условима. У складу са постављеним циљем непосредни задаци истраживања укључивали су:

- испитивање дејства антоцијана и њихових метаболита на адхезију моноцита за активирани ендотелне ћелије и трансендотелијалну миграцију моноцита,

- испитивање утицаја ових једињења на експресију гена, сигналне путеве и експресију микро-РНК у ендотелним ћелијама, и
- утврђивање дејства испитиваних једињења на активацију тромбоцита и њихову агрегацију са моноцитима и неутрофилима.

Поглавље **Материјал и методе** садржи информације о испитиваним једињењима, хемикалијама, комерцијалним комплетима и антителима коришћеним у раду, и даје детаљан опис експерименталних процедура примењених током израде дисертације. Фазе експерименталних процедура су сумиране одговарајућим шематским приказима, што додатно олакшава њихово праћење и репродуковање.

У оквиру истраживања утицаја антоцијана и њихових метаболита на функцију ендотелних ћелија коришћене су примарне културе хуманих ендотелних ћелија пупчане вене (HUVEC) и ћелијска линија моноцита (THP1). У складу са резултатима студија биолошке расположивости антоцијана у људском организму, ендотелне ћелије су третиране антоцијанима (цијанидин-3-глукозидом, цијанидин-3-арабинозидом, цијанидин-3-галактозидом, пеонидин-3-глукозидом и делфинидин-3-глукозидом) или 4-хидроксибензалдехидом, током 3 сата, а метаболитима микрофлоре дебелог црева (протокатехуинском, ферулинском, хипурном и ванилинском киселином) током 18 сати, у распону физиолошки релевантних концентрација, од 0.1 μ М до 2 μ М. Инфламација и активација ендотелних ћелија индукована је помоћу проинфламаторног цитокина, фактора некрозе тумора алфа (TNF α), након чега су додавани моноцити, а њихова адхезија за ендотелне ћелије је мерена методом проточне цитометрије. Поред овога, у циљу испитивања могућег кумулативног деловања једињења истовремено присутних у циркулацији, припремљене су две смеше једињења: смеша А (једињења кратко присутна у циркулацији) и смеша Б (једињења дуго присутна у циркулацији). Концентрације компонената ових смеша изабране су тако да најближе одговарају резултатима доступних студија биолошке расположивости антоцијана у људском организму. Додатно, третман ендотелних ћелија смешом А, а потом смешом Б (назван смеша А+Б), креиран је како би се што веродостојније опонашали услови којима су ендотелне ћелије изложене током дужег времена након дијетарног уноса антоцијана. Наведене смеше су даље коришћене за испитивање утицаја ових једињења на трансендотелијалну миграцију моноцита, изазвану хемоатрактантом, моноцитиним хемотаксним протеином 1 (MCP-1), коришћењем уметака са порама величине 5 μ m (енгл. Transwell system). У циљу описивања механизма деловања антоцијана и њихових метаболита на процесе адхезије и трансендотелне миграције, испитан је утицај смеша ових једињења у погледу експресије гена, сигналних путева и експресије микро-РНК у ендотелним ћелијама. Анализа експресије гена вршена је методом реакције ланчаног умножавања у реалном времену (енгл. real-time PCR), употребом макроареја (енгл. Taqman Low Density Arrays) који су омогућили истовремену анализу нивоа експресије 93 различита гена. Биоинформатичка анализа резултата генске експресије спроведена је, уз коришћење MetaCore софтвера и KEGG базе података, како би се открили транскрипциони фактори и сигнални протеини који би могли допринети уоченом деловању испитиваних једињења на експресију гена. У циљу испитивања могућих интеракција антоцијана и њихових метаболита (лиганада) са идентификованим сигналним протеинима и транскрипционим факторима, *in silico* анализа молекулског уклапања (молекулски докинг) изведена је помоћу AutoDock Vina програма. Такође, дејство антоцијана и њихових метаболита на активацију неколико сигналних молекула (ERK1/2, NF- κ B-p65) испитано је имуноблотинг (енгл. Western blot) анализом. Утицај смеша једињења на експресију микро-РНК у ендотелним ћелијама истражен је помоћу микро-РНК микроареја.

Студија утицаја антоцијана и њихових метаболита на функцију тромбоцита подразумевала је праћење њихове активације и агрегације са леукоцитима у узорцима пуне крви здравих добровољаца мушког пола. Одређивање параметара активације тромбоцита односно површинске експресије П-селектина и гликопротеина GPIIb/IIIa, и агрегације тромбоцита са неутрофилима и моноцитима, након излагања агонисту, аденозин-дифосфату, вршено је методом проточне цитометрије.

Добијени резултати су статистички обрађени у GraphPad Prism или SPSS софтверским пакетима.

На основу података изнетих у овом поглављу дисертације може се закључити да је кандидаткиња направила оптималан избор савремених метода, које у потпуности одговарају постављеним задацима истраживања.

У поглављу **Резултати** експериментално добијени резултати су подељени у логично организоване целине и јасно приказани графички и табеларно.

Резултати ове дисертације показали су да је, са изузетком 4-хидроксибензалдехида, третман ендотелних ћелија физиолошки релевантним концентрацијама антоцијана и њихових метаболита довео до значајног смањења адхезије моноцита за активирани ендотелне ћелије. Статистички значајно смањење адхезије забележено је и након третмана ендотелних ћелија смешама испитиваних једињења, док адитивни ефекат појединачних компонената смеша није уочен. Поред овога, показано је, по први пут, да је третман ендотелних ћелија поменути смешама довео и до значајног смањења трансендотелијалне миграције моноцита индуковане хемоатрактантом, MCP-1. У складу са овим резултатима, анализа генске експресије у ендотелним ћелијама третираним смешама једињења показала је промену у експресији гена укључених у регулацију адхезије ћелија, реорганизације актинског цитоскелета, фокалне адхезије и трансмиграције леукоцита. Биоинформатичка анализа резултата генске експресије омогућила је, да се открију транскрипциони фактори који би могли допринети уоченом деловању испитиваних једињења на експресију гена, као и да се идентификују сигнални протеини који регулишу активност ових транскрипционих фактора. Молекулско уклапање антоцијана и њихових метаболита са 62 идентификована макромолекула, укључена у регулацију различитих ћелијских процеса попут инфламације, ћелијске пролиферације, миграције и преживљавања, показало је да ова једињења могу остварити интеракције са испитиваним сигналним протеинима. Запажено је да антоцијани показују већи афинитет везивања за сигналне протеине него њихови метаболити. У оквиру групе испитиваних антоцијана или њихових метаболита уочен је сличан афинитет везивања за циљане макромолекуле, што иде у прилог хипотези да је недостатак адитивног ефекта појединачних једињења смеша резултат њихове компетиције за исто место деловања. Поред овога, резултати молекулског докинга указују на то да антоцијани и њихови метаболити остварују интеракције са каталитичким доменом неколико протеинских киназа (нпр. MEK2, IKK α , FAK1, JAK3, p38 β) и да потенцијално могу утицати на њихову киназну активност и активацију нисходних сигналних молекула. Предвиђено деловање испитиваних једињења на сигналне путеве је потврђено имуноблотинг анализом. У оквиру ових истраживања, третман ендотелних ћелија смешом А довео до смањења фосфорилације сигналног протеина ERK1/2 као и транскрипционог фактора NF- κ B-p65, док је смеша Б утицала на смањење фосфорилације NF- κ B-p65. Резултати ове дисертације показали су, по први пут, и способност антоцијана и њихових метаболита да, при физиолошки релевантним концентрацијама, врше модулацију експресије микро-РНК у активираним ендотелним ћелијама. Испитивана једињења посебно су утицала на промену експресије микро-РНК повезаних са настанком ендотелне дисфункције и атеросклерозе (нпр. let-7f, miR-181b, miR-125a i miR-26a), доприносећи уоченим променама ендотелне функције.

Поред ефекта на ендотелне ћелије, уочено је и повољно дејство испитиваних једињења на функцију тромбоцита. Резултати ових истраживања показали су да са изузетком ванилинске киселине, како антоцијани тако и њихови метаболити доводе до значајног смањења бар једног од испитиваних параметара тј. активације тромбоцита или њихове агрегације са леукоцитима индуковане агонистом.

У поглављу **Дискусија** добијени резултати су детаљно анализирани и упоређени са доступним литерарним подацима. Дискусија је написана систематично и јасно, са критичким освртом на резултате досадашњих истраживања у области. У оквиру овог поглавља објашњен је дизајн експеримента тј. образложен је одабир испитиваних једињења, коришћених концентрација и примењене методологије и истакнуте су њихове предности у односу на друге студије. Наглашена су сва нова сазнања до којих се дошло у овој докторској дисертацији и истакнут је њихов значај за истраживања улоге антоцијана у превенцији кардиоваскуларних болести.

У поглављу **Закључци** сумирани су добијени резултати и изнесен је преглед најзначајнијих закључака. Закључено је, да антоцијани и њихови метаболити, при физиолошки релевантним концентрацијама, доводе до значајног смањења адхезије моноцита и њихове трансендотелијалне миграције, доприносећи одржању интегритета ендотела приликом запаљенског процеса. Уочено дејство испитиваних једињења на функцију ендотелних ћелија је последица сложених молекуларних механизима који укључују дејство на сигналне путеве, експресију гена и микро-РНК. Поред ефекта на ендотелне ћелије, наведена једињења испољавају повољно дејство и на функцију тромбоцита, изражено смањењем активације тромбоцита и њихове агрегације са леукоцитима, као процеса који значајно доприносе настанку кардиоваскуларних болести. Сходно томе, резултати ове докторске дисертације показали су позитиван утицај антоцијана и њихових метаболита, у физиолошки релевантним концентрацијама, на функцију ендотелиних ћелија и тромбоцита, и тиме, пружили нова сазнања о механизмима њиховог кардиопротективног деловања. На крају овог поглавља добијени резултати ове дисертације сумирани су и сликовно.

У поглављу **Литература** наведено је 328 релевантних библиографских јединица, што указује да је кандидаткиња темељно приступила изучавању проблематике докторске дисертације. Наведене научне публикације се односе на области које су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава добијене резултате и потврђује њихов значај. У оквиру овог поглавља укључен је велики број нових литературних извора публикованих у последњих пар година, што показује да кандидаткиња прати савремене научне токове.

У оквиру поглавља **Прилози** налази се 6 табела и једна слика.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **I. Krga**, N. Vidovic, D. Milenkovic, A. Konic-Ristic, F. Stojanovic, C. Morand, M. Glibetic, Effects of anthocyanins and their gut metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and their aggregation with monocytes and neutrophils, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 645 (2018) 34-41. (M22, IF₂₀₁₆ 3.165)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986118300237>
2. **I. Krga**, L.E. Monfoulet, A. Konic-Ristic, S. Mercier, M. Glibetic, C. Morand, D. Milenkovic, Anthocyanins and their gut metabolites reduce the adhesion of monocyte to

TNF α -activated endothelial cells at physiologically relevant concentrations, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 599 (2016) 51-59. (M22, IF₂₀₁₆ 3.165)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000398611630025X>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **I. Krga**, S. Mercier, R. Tamaian, C. Boby, L-E. Monfoulet, C. Morand, D. Milenkovic. Anthocyanins and their gut metabolites attenuate monocyte adhesion and transendothelial migration through nutrigenomic mechanisms regulating endothelial cell permeability. 8th International Conference on Polyphenols and Health, 3rd-6th October 2017, Quebec City, Canada, Oral presentation, S11. (M32)
2. **I. Krga**, N. Kardum, F. Stojanovic, A. Konic-Ristic, D. Milenkovic M. Glibetic. Effects of physiologically-relevant concentrations of anthocyanins and their gut metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and aggregation. 8th International Conference on Polyphenols and Health, 3rd-6th October 2017, Quebec City, Canada, p04-071. (M34)
3. **I. Krga**, C. Morand, C. Boby, L.E. Montfoulet, M. Glibetic, D. Milenkovic. Mixtures of anthocyanins and their gut metabolites attenuate monocyte adhesion and transendothelial migration through nutrigenomic mechanisms regulating endothelial cell permeability. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS) with international participation. 20th-22nd September 2017. Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p 50. (M34)
4. A. Konic-Ristic, **I. Krga**, N. Kardum, D. Milenkovic, M. Glibetic. Effects of physiologically-relevant concentrations of anthocyanins and their metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and aggregation. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS) with international participation. 20th-22nd September 2017, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p 144. (M34)
5. **I. Krga**, R. Tamaian, C. Boby, S. Mercier, C. Morand, D. Milenkovic. Anthocyanins and their gut metabolites reduce monocyte adhesion and migration across TNF α -activated endothelial cells through nutrigenomic mechanisms regulating endothelial integrity. 3rd Scientific Workshop: "Omics breakthroughs in the health effects of plant food bioactive", 20th-21st September 2017, Thessaloniki, Greece, Book of Abstracts, p 8. (M34)
6. **I. Krga**, L.E. Monfoulet, A. Konic-Ristic, S. Mercier, M. Glibetic, C. Morand, D. Milenkovic. Effect of anthocyanins and their gut metabolites on monocyte adhesion to endothelial cells at physiologically-relevant concentrations. 7th International Conference on Polyphenols and Health, 27th-30th October 2015, Tours, France, Book of Abstracts, p 220. (M34)

Мишљење и предлог Комисије:

На основу прегледа докторске дисертације Ирене С. Крге, под насловом „Утицај антоцијана и њихових метаболита на функцију ендотелних ћелија и тромбоцита човека *in vitro*“ ("Effects of anthocyanins and their metabolites on the function of human endothelial cells and platelets *in vitro*"), Комисија закључује да поменута дисертација представља оригиналан научни рад са јасно дефинисаним циљевима заснованим на добром познавању научне проблематике, као и адекватно осмишљеним и успешно изведеним експериментима. Резултати дисертације доприносе разумевању механизма преко којих дијетарни антоцијани остварују своје заштитно дејство на кардиоваскуларно здравље и пружају важан допринос истраживању састојака намирница у циљу превенције кардиоваскуларних болести.

Кандидаткиња је кроз рад на докторској дисертацији показала посвећеност, истрајност, истраживачку зрелост и самосталност, како у експерименталном раду, тако и при тумачењу добијених резултата. Резултати приказани у овој дисертацији публиковани су у два оригинална рада док је трећи рад у припреми. Такође, кандидаткиња је показала добро познавање литературе и проблематике релевантне научне области што додатно потврђују и два публикована прегледна рада чији је аутор.

На основу свега изнетог, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу докторске дисертације испуњени и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Ирене С. Крге под насловом „Утицај антоцијана и њихових метаболита на функцију ендотелних ћелија и тромбоцита човека *in vitro*“ ("Effects of anthocyanins and their metabolites on the function of human endothelial cells and platelets *in vitro*"), и одобри кандидаткињи јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

др Марија Глибетић, научни саветник,
Центар изузетне вредности у области истраживања
исхране и метаболизма, Институт за медицинска
истраживања, Универзитет у Београду

др Тања Јевђовић, доцент,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Љуба Мандић, редован професор,
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Драган Миленковић, научни саветник,
Национални институт за агрономска истраживања,
Универзитет Клермон Оверња, Француска,

др Claude Beaudoin, редован професор,
Универзитет Клермон Оверња, Француска

др Sophie Layé, научни саветник,
Национални институт за агрономска истраживања,
Универзитет у Бордоу, Француска

У Београду, 20.04.2018 године.

**TO THE TEACHING-SCIENTIFIC COUNCIL OF THE FACULTY OF BIOLOGY,
UNIVERSITY OF BELGRADE**

At the 6th regular session of the Teaching-Scientific Council of the Faculty of Biology, University of Belgrade, held on 13 April 2018, the report made by the mentors Dr Marija Glibetić and Dr Dragan Milenković about the Doctoral Dissertation written by Irena S. Krga, Research trainee at the Centre of Research Excellence in Nutrition and Metabolism, Institute for Medical Research, University of Belgrade, titled "**Effects of anthocyanins and their metabolites on the function of human endothelial cells and platelets *in vitro***", was accepted. The Commission for the Review and Evaluation of the Doctoral Dissertation was appointed as follows: Dr Marija Glibetić, Principal Research Fellow, Centre of Research Excellence in Nutrition and Metabolism, Institute for Medical Research, University of Belgrade, Dr Tanja Jevđović, Assistant professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Dr Ljuba Mandić, Full professor, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Dr Dragan Milenkovic, Senior Research Scientist, National Institute for Agricultural Research, University Clermont Auvergne, France, Dr Claude Beaudoin, Full professor, University of Clermont Auvergne, France, Dr Sophie Layé, Research director, National Institute for Agricultural Research, University of Bordeaux, France.

The Commission reviewed the Candidate's doctoral dissertation and is submitting the following

REPORT

General information about the doctoral dissertation:

The doctoral dissertation of Irena S. Krga, titled: "Effects of anthocyanins and their metabolites on the function of human endothelial cells and platelets *in vitro*" was written under joint supervision in accordance with the International Agreement on Joint Supervision of Doctoral Thesis ("Cotutelle") signed between the University of Belgrade in Serbia and the University Clermont Auvergne in France. The experimental part of this thesis was conducted in the Centre of Research Excellence in Nutrition and Metabolism of the Institute for Medical Research, the University of Belgrade in Serbia and the National Institute of Agricultural Research, Clermont-Ferrand/Theix in France.

The doctoral dissertation is written in English on 154 pages. The dissertation contains: Title page in English, Serbian and French, Information about the Thesis Defence Committee Members, Acknowledgements, Resume in English, Serbian and French with keywords, List of abbreviations, List of tables and figures, Table of contents and Text organised by chapters. The text of the thesis is organised into 8 chapters: Introduction (35 pages), The Aim of the thesis (1 page), Material and methods (27 pages), Results (30 pages), Discussion (15 pages), Conclusions (3 pages), References (23 pages) and Supplementary files (20 pages). The dissertation contains 20 tables, 43 figures and 328 reference sources. At the end of the dissertation the following

documents are enclosed: Author's biography, Statement of Authorship, Statement of Identity of Printed and Electronic Version of Doctoral Dissertation and Statement of Use.

The analysis of doctoral dissertation:

The "**Introduction**" chapter of the doctoral dissertation is divided into three sections and gives a detailed overview of current knowledge about cardiovascular diseases and the role of anthocyanins in their prevention. The chapter begins with the classification of cardiovascular diseases, their epidemiology and risk factors, as well as the description of atherosclerosis, a chronic inflammatory disorder of arterial blood vessels that is the main cause of cardiovascular diseases. Special attention is given to endothelial dysfunction, particularly the adhesion of leukocytes to activated endothelial cells and their transendothelial migration that represent the initial steps in atherosclerosis development. This section also shows the important role of platelets in the pathogenesis of atherosclerosis, achieved through their activation and interactions with leukocytes and endothelial cells, and underlines that both endothelial cells and platelets present attractive targets for exploring cardiovascular disease prevention and management. The second section of this chapter describes the role of nutrition in maintaining cardiovascular health. It shows the association between the diet rich in fruits and vegetable and reduced cardiovascular disease risk and describes polyphenols, the secondary metabolites of plants, which are believed to be responsible for the protective effects of plant foods against cardiovascular diseases. The third section of the introduction chapter is dedicated to anthocyanins, a group of polyphenol compounds that are the subject of this doctoral dissertation. This section describes their chemical structure, physical and chemical properties, dietary sources and daily intakes, as well as their absorption, distribution, metabolism and elimination in the human body, with a special focus on forms and concentrations of compounds that are present in the circulation after the anthocyanin consumption and that may exhibit biological effects. Furthermore, detailed overview of the epidemiological, clinical and preclinical evidence of anthocyanin beneficial effect on cardiovascular health is provided, together with the potential molecular mechanisms underlying these cardioprotective effects, such as modulation of gene expression, activation of cell signalling pathways, and micro RNA expression. This section also gives a critical analysis of the available *in vitro* studies, underlining the physiologically irrelevant study design as well as the use of methods that are not adequate for the examination of the proposed anthocyanin multi-target mode of action as the major limitations of these studies. It also highlights an insufficient number of studies investigating the effect of anthocyanins on platelet function and provides recommendations for future research that will allow the production of relevant data about the mechanisms of action of these compounds.

Based on the data presented in the Introduction, the chapter "**The aim of the thesis**", clearly defines the aim and objectives of this research project. The aim of this thesis was to investigate the effect of anthocyanins and their metabolites on endothelial and platelet function and identify the underlying molecular mechanisms of action using physiologically relevant *in vitro* study design. In line with the set aim, the direct research objectives included:

- investigations of the effect of anthocyanins and their metabolites on the adhesion of monocytes to activated endothelial cells and monocyte transendothelial migration,
- investigations of the effect of these compounds on gene expression, cell signalling pathways, and expression of micro RNA in endothelial cells, and
- examination of the effect of investigated compounds on platelet activation and their aggregation with monocytes and neutrophils.

The chapter "**Material and Methods**" contains information about tested compounds, chemicals, commercial kits and antibodies used in the experimental work, and gives a detailed description of the experimental procedures applied during the preparation of the dissertation.

The stages of the experimental procedures are summarised by the corresponding schematic representations, which additionally facilitates their understanding and reproduction.

For the investigations of the effect of anthocyanins and their metabolites on endothelial cell function, primary culture of human endothelial cells from umbilical vein (HUVEC) and human monocytic cell line (THP1) were used. In accordance with the results from anthocyanin bioavailability studies in humans, endothelial cells were treated with anthocyanins (cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside, cyanidin-3-galactoside, peonidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside) or 4-hydroxybenzaldehyde for 3 hours, and gut metabolites (protocatechuic, ferulic, hippuric and vanillic acid) for 18 hours. These compounds were tested over a range of physiologically relevant concentrations, from 0.1 μ M to 2 μ M. Inflammation and activation of endothelial cells were induced by the proinflammatory cytokine tumour necrosis factor alpha (TNF α), after which monocytes were added and their adhesion to endothelial cells was measured by flow cytometry. To further investigate a potential synergistic effect of compounds that are simultaneously present in the bloodstream, two mixtures of compounds were created: mix A (compounds present in the circulation for a short time) and mix B (compounds present in the circulation for a long time). The concentrations of compounds in these mixtures were closest to those previously identified in plasma in the anthocyanin bioavailability studies in humans. Additionally, the treatment of endothelial cells with the mix A and then the mix B, named mix A+B, was created to imitate as closely as possible anthocyanin pharmacokinetics following the anthocyanin consumption. These mixtures were further used to study the effect of these compounds on monocyte transendothelial migration induced by chemoattractant, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), by using Transwell system with inserts containing 5 μ m pores. To further identify the mechanism underlying the effects of anthocyanins and their metabolites on adhesion and transendothelial migration processes, the impact of mixtures of these compounds on endothelial cell gene expression, signalling pathways, and micro RNA expression was examined. The gene expression analysis was carried out by real-time PCR using TaqMan Low-Density Arrays, which enabled the simultaneous analysis of the expression of 93 different genes. Bioinformatics analyses of gene expression data were performed using MetaCore software and KEGG database to detect transcription factors and signal proteins that could contribute to the observed effect of tested compounds on gene expression. To examine possible interactions of anthocyanins and their metabolites (ligands) with the identified cell signalling proteins and transcription factors (targets), *in silico* molecular docking was then carried out by AutoDock Vina software. Furthermore, the effect of anthocyanins and their metabolites on the activation of few signalling molecules (ERK1/2, NF- κ B-p65) was analysed by Western blot. The impact of mixtures on the expression of micro RNA in endothelial cells was investigated using micro RNA microarrays.

A study of the effect of anthocyanins and their metabolites on platelet function included the assessments of platelet activation and aggregation with leukocytes using whole blood samples from healthy male volunteers. Determination of platelet activation parameters, i.e. surface expression of P-selectin and GPIIb/IIIa glycoproteins, and platelet aggregation with neutrophils and monocytes, following the exposure to agonist adenosine diphosphate, was performed by flow cytometry.

The obtained results were statistically processed in GraphPad Prism or SPSS software packages.

Based on the data presented in this chapter of the thesis, it can be concluded that the Candidate made an optimal choice of modern methods that fully correspond to the set research tasks.

In the chapter "**Results**", the obtained results are presented in logically organised sections and clearly depicted in graphs and tables.

The results of this thesis showed that, with the exception of 4-hydroxybenzaldehyde, the pre-treatment of endothelial cells with physiologically relevant concentrations of anthocyanins and their metabolites significantly decreased the adhesion of monocytes to activated endothelial cells. A statistically significant reduction in monocyte adhesion was also detected when endothelial cells were pre-treated with the mixtures of the tested compounds, while no additive effect of individual components of the mixture was observed. Furthermore, it was shown for the first time, that the pre-treatment of endothelial cells with these mixtures significantly attenuated MCP-1-induced monocyte transendothelial migration. In agreement with these results, gene expression analysis revealed that the pre-treatment of endothelial cells with the mixtures of tested compounds modulated the expression of genes involved in regulation of cell-cell adhesion, actin cytoskeleton reorganisation, focal adhesion and leukocyte transmigration. Bioinformatics analyses of gene expression data allowed the identification of potential transcription factors involved in the observed nutrigenomic effects and cell signalling proteins regulating their activity. Molecular docking of anthocyanins and their metabolites with 62 identified macromolecules, involved in the regulation of various cellular processes such as inflammation, cell proliferation, migration and survival, revealed that these compounds present the capacity to bind cell signalling proteins. Anthocyanins were shown to be stronger binders than their metabolites. The similar binding affinities for the same targets were observed when comparing compounds within the anthocyanin and metabolite groups, contributing to the hypothesis that the lack of cumulative effect of compounds within the mixtures is the result of their competition for the same target of action. Furthermore, docking results suggest that anthocyanins and their metabolites can bind to the protein kinase domains of several cell signalling proteins (e.g. MEK2, IKK α , FAK1, JAK3, p38 β) and possibly affect their kinase activity and phosphorylation of downstream cell signalling proteins. These results are in agreement with the effect of tested compounds on cell signalling pathways revealed by Western blot analysis. In these investigations, the pre-treatment of endothelial cells with the mix A attenuated the phosphorylation of ERK1/2 signalling protein and NF- κ B-p65 transcription factor, while mix B reduced the phosphorylation of NF- κ B-p65. Results from this thesis have shown, for the first time, the capacity of anthocyanins and their metabolites, at physiologically relevant concentrations, to modulate the expression of miRNA expression in activated endothelial cells. Tested compounds especially affected the expression of miRNAs involved in, endothelial dysfunction and atherosclerosis development (e.g. let-7f, miR-181b, miR-125a and miR-26a), contributing to the observed changes in endothelial cell function.

In addition to their effect on endothelial cells, the beneficial effect of tested compounds on platelet function was also observed. These investigations showed that except vanillic acid, both anthocyanins and their metabolites significantly attenuated at least one of the tested parameters, i.e. agonist-induced platelet activation or their aggregation with leukocytes.

In the "**Discussion**" chapter, the obtained results are thoroughly analysed and compared with the available literature data. The discussion was written systematically and clearly, with a criticism of the results of previous research in the field. This chapter provides the rationale for the used experimental design, i.e., the selection of used compounds, concentrations and applied methodology, and highlights their advantages in comparison to other studies. All the new knowledge generated in this doctoral dissertation are summarised, and their significance for the investigations of the role of anthocyanin in the prevention of cardiovascular diseases is underlined. It summarises all the new knowledge generated in this doctoral dissertation and underlines their significance for the investigations of the role of anthocyanin in the prevention of cardiovascular diseases.

In the chapter "**Conclusions**", the Candidate summarises the obtained results and gives an overview of the most important conclusions. It was concluded that anthocyanins and their

metabolites reduce monocyte adhesion and transendothelial migration, the processes that represent the initial steps in the development of atherosclerosis, by maintaining the endothelial integrity during the inflammatory stress. The observed effects of tested compounds on endothelial function are the result of complex molecular mechanisms of action that include the effects on cell signalling pathways, gene expression and micro RNA expression. In addition to their impact on endothelial cells, these compounds also exhibit the beneficial effects on platelet function, by reducing platelet activation and their aggregation with leukocytes, the processes that are key contributors to the development of cardiovascular diseases. Thus, the results of this doctoral dissertation showed the positive effects of anthocyanins and their metabolites, at physiologically relevant concentrations, on endothelial and platelet function, and provided new insights into the mechanisms underlying their cardioprotective effects. At the end of this chapter, the obtained results of this dissertation are also graphically summarised.

The chapter "**References**" lists 328 relevant reference sources, indicating that the Candidate approached the study of the issues of doctoral dissertation thoroughly. The above scientific publications refer to the areas that are of importance for the dissertation and are cited in a way that explains the obtained results and confirms their significance. This chapter includes a large number of new literary sources that were published in the last couple of years, which shows that the Candidate is up to date with the latest scientific knowledge.

The chapter "**Supplementary files**" contains 6 tables and 1 figure.

Papers and congress announcements from the doctoral dissertation:

B1. Papers published in international journals

1. **I. Krga**, N. Vidovic, D. Milenkovic, A. Konic-Ristic, F. Stojanovic, C. Morand, M. Glibetic, Effects of anthocyanins and their gut metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and their aggregation with monocytes and neutrophils, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 645 (2018) 34-41. (M22, IF₂₀₁₆ 3.165)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986118300237>

2. **I. Krga**, L.E. Monfoulet, A. Konic-Ristic, S. Mercier, M. Glibetic, C. Morand, D. Milenkovic, Anthocyanins and their gut metabolites reduce the adhesion of monocyte to TNF α -activated endothelial cells at physiologically relevant concentrations, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 599 (2016) 51-59. (M22, IF₂₀₁₆ 3.165)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000398611630025X>

B3. Congress announcements at the meetings of international importance

1. **I. Krga**, S. Mercier, R. Tamaian, C. Boby, L-E. Monfoulet, C. Morand, D. Milenkovic. Anthocyanins and their gut metabolites attenuate monocyte adhesion and transendothelial migration through nutrigenomic mechanisms regulating endothelial cell permeability. 8th International Conference on Polyphenols and Health, 3rd-6th October 2017, Quebec City, Canada, Oral presentation, S11. (M32)
2. **I. Krga**, N. Kardum, F. Stojanovic, A. Konic-Ristic, D. Milenkovic M. Glibetic. Effects of physiologically-relevant concentrations of anthocyanins and their gut metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and aggregation. 8th International

Conference on Polyphenols and Health, 3rd-6th October 2017, Quebec City, Canada, p04-071. (M34)

3. **I. Krga**, C. Morand, C. Boby, L.E. Montfoulet, M. Glibetic, D. Milenkovic. Mixtures of anthocyanins and their gut metabolites attenuate monocyte adhesion and transendothelial migration through nutrigenomic mechanisms regulating endothelial cell permeability. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS) with international participation. 20th-22nd September 2017. Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p 50. (M34)
4. A. Konic-Ristic, **I. Krga**, N. Kardum, D. Milenkovic, M. Glibetic. Effects of physiologically-relevant concentrations of anthocyanins and their metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and aggregation. 1st Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS) with international participation. 20th-22nd September 2017, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p 144. (M34)
5. **I. Krga**, R. Tamaian, C. Boby, S. Mercier, C. Morand, D. Milenkovic. Anthocyanins and their gut metabolites reduce monocyte adhesion and migration across TNF α -activated endothelial cells through nutrigenomic mechanisms regulating endothelial integrity. 3rd Scientific Workshop: "Omics breakthroughs in the health effects of plant food bioactive", 20th-21st September 2017, Thessaloniki, Greece, Book of Abstracts, p 8. (M34)
6. **I. Krga**, L.E. Monfoulet, A. Konic-Ristic, S. Mercier, M. Glibetic, C. Morand, D. Milenkovic. Effect of anthocyanins and their gut metabolites on monocyte adhesion to endothelial cells at physiologically-relevant concentrations. 7th International Conference on Polyphenols and Health, 27th-30th October 2015, Tours, France, Book of Abstracts, p 220. (M34)

Opinion and proposal of the Commission:

Based on the review of Irena S. Krga's doctoral dissertation titled "Effects of anthocyanins and their metabolites on the function of human endothelial cells and platelets *in vitro*", the Commission concludes that the aforementioned dissertation represents an original scientific work with clearly defined goals based on good knowledge of scientific issues, as well as adequately designed and successfully performed experiments. The results of the dissertation contribute to understanding the mechanisms by which dietary anthocyanins achieve their protective effect on cardiovascular health and provide an important contribution to the research of food ingredients in the prevention of cardiovascular diseases.

Through her doctoral dissertation, the Candidate showed dedication, perseverance, research maturity and independence, both in experimental work and in interpreting the obtained results. The results presented in this dissertation were published in two original papers while the third paper is in the process of preparation. The Candidate also showed good knowledge of the literature and issues of the relevant scientific field, which is additionally confirmed by her two published review papers.

On the basis of everything stated, the Commission concludes that the tasks set up for the doctoral dissertation were fulfilled and with satisfaction proposes to the Teaching-Scientific Council of the Faculty of Biology, University of Belgrade, to accept the positive evaluation of the doctoral dissertation of Irena S. Krga titled "**Effects of anthocyanins and their metabolites on the function of human endothelial cells and platelets *in vitro***", and approves to the Candidate a public defense of her dissertation.

COMMISSION:

Dr Marija Glibetić, Principal Research Fellow,
Centre of Research Excellence in Nutrition and
Metabolism, Institute for Medical Research,
University of Belgrade

Dr Tanja Jevđović, Assistant professor,
Faculty of Biology, University of Belgrade

Dr Ljuba Mandić, Full professor,
Faculty of Chemistry, University of Belgrade

Dr Dragan Milenkovic, Senior Research Scientist,
National Institute for Agricultural Research, University
Clermont Auvergne, France

Dr Claude Beaudoin, Full professor,
University of Clermont Auvergne, France

Dr Sophie Layé, Research director,
National Institute for Agricultural Research,
University of Bordeaux, France

In Belgrade, 20.04.2018.