

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње Александре М. Ђурђевић Ђелмаш, пријављене под насловом „Примена молекулског моделовања и експерименталних метода у циљу проучавања утицаја перфлуороалкил супстанци на хумане протеине крви“.

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Теоријска хемија

2. Предмет научног истраживања:

Истраживање ће бити усмерено на испитивање утицаја перфлуороалкил киселина из групе перфлуороалкил супстанци, ПФАС (енгл. *Per- and polyfluoroalkyl substances, PFAS*), на протеине крви, попут, фибриногена и алфа-2-макроглобулина. С обзиром на то да су ПФАС познати по својој персистентности у окружењу и токсичном утицају на људско здравље, ова истраживања имају изузетан значај за разумевање њиховог метаболичког понашања и интеракција у људском организму. Рачунарским и експерименталним методама ће се детаљно појаснити на који начин долази до промена у структури и функцији протеина од интереса при везивању лиганата.

3. Основне хипотезе:

ПФАС представљају групу индустријских пер- и полифлуороалкил супстанци које се користе од почетка двадесетог века. Захваљујући својим изузетним својствима, ове супстанце су постале незаобилазне у више од 25 различитих индустрија. Карактерише их изузетна отпорност на високе температуре и притиске, као и растворљивост у хидрофилним и хидрофобним растварачима. Посебно је значајна јачина угљеник-флуор везе, што их чини хемијски и биохемијски изузетно стабилним и отпорним на разградњу. Управо због ових карактеристика, ПФАС су широко примењивани у бројним технолошким и индустријским процесима [1,2]. На тржишту је доступно више од 5000 различитих ПФАС молекула, али многи од њих су недовољно истражени и познати као прекурсори ПФАС-ова [3]. Ове супстанце могу се класификовати према различитим критеријумима, укључујући њихову молекулску структуру и природу. С тога, посебна категорија ових једињења припада карбоксилним и сулфонским киселинама,

једнозначно зване перфлуороалкил киселине, ПФАК (енгл. *Perfluoroalkyl acids, PFAA*). Једна од најчешћих класификација перфлуорокарбоксилних киселина заснована је на дужини ланца угљеникових атома. Према том критеријуму, подела је на ултра-кратколанчане (са два или три угљеника), кратколанчане (од четири до седам угљеника) и дуголанчане перфлуорокарбоксилне киселине (са више од осам угљеника). Ова класификација је значајна јер физичко-хемијска својства и биолошки утицаји ових супстанци често зависе управо од дужине угљеничног ланца [4,5]. Због широке и дуготрајне примене, ПФАС су доспели у различите сегменте животне средине, укључујући пијаћу воду и земљиште. Поред тога, високе концентрације ПФАС детектоване су у људској крви. Ова ситуација изазива значајну забринутост због потенцијалних утицаја на здравље и еколошких последица. Најзаступљенији и најдетектабилнији ПФАС у воденом систему су ПФОА (перфлуорооктанска киселина) и ПФОС (перфлуоросулфонат), чије концентрације се мере у микрограмима по литру. Последњих година све већа пажња усмерена је на кратколанчане молекуле, који се све чешће користе као замена за дуголанчане јер се сматрају мање токсичним. Међутим, и ови молекули показују способност апсорпције у људски организам оралним путем. ПФАС се не метаболишу у организму и поред крви могу се детектовати у различитим ткивима у концентрацијама које се изражавају у нанограмима по литру. Дуголанчани молекули се најчешће складиште у јетри, а њихов полу-живот у организму износи између 2,3 и 5,4 године. Ови подаци указују на потребу за пажљивијим праћењем и контролом изложености овим супстанцама [6].

Перфлуороалкилне киселине остварују специфичне интеракције са протеинима крви, као што су хумани серум албумин, хемоглобин и каталаза, што значајно утиче на њихову токсичност и биорасположивост [7,8,9]. До сада није показано везивање ПФАК за фибриноген, главни коагулациони протеин, масе 360 килодалтона и алфа-2-макроглобулин који је универзална антипротеаза, масе 720 килодалтона. Комбиновањем метода рачунарске хемије и експерименталним техникама могу се идентификовати и описати кључне аминокиселине и интеракције одговорне за стабилност комплекса између ПФАС и протеина и утицај њиховог везивања на биолошку функцију протеина. Методе рачунарске хемије, као што су молекулско моделовање и молекулска динамика су данас неизоставни у погледу анализе структуре протеина и њиховог понашања у реалним системима [10,11].

4. Циљ истраживања:

Циљ овог истраживања је разумевање механизма везивања три перфлуороалкил киселине (ултракратколанчане: трифлуоросирћетне киселине (ТФА); кратколанчане: перфлуоробутанске киселине (ПФБА); и дуголанчане: перфлуорооктанске киселине (ПФОА)) за хумане протеине крви, фибриноген и алфа-2-макроглобулин, применом метода рачунарске хемије и експерименталним техникама, са посебним фокусом на идентификацију специфичних интеракција које потенцијално утичу на њихову стабилност и биолошку активност.

5. Методологија:

Користиће се квантно-хемијски прорачуни за одређивање геометрије сва три лиганда (ПФАК) и прецизно одређивање енергија протеин-лиганд интеракција. Молекулски докинг ће бити коришћен за одређивање најповољнијег места везивања три лиганда у протеинима (хумани фибриноген и алфа-2-макроглобулин) и анализирање интеракција између оба протеина и лиганда, на постојећим кристалним структурама из ПДБ (енгл. *Protein data bank, PDB*) банке података и/или на моделованим протеинским структурама. У тим корацима ће бити неопходно знање биоинформатичких метода, односно, претраживање протеинских база података у циљу проналажења најкомплетније структуре. Такође, користиће се и молекулска динамика за симулацију конформационих и структурних промена протеина након везивања одређеног ПФАК лиганда у циљу унапређења резултата добијених молекулским докингом.

Експерименталне технике ће бити коришћене за додатну анализу на изолованим протеинима (фибриноген и алфа-2-макроглобулин) из крви здравих волонтера (Етичка дозвола добијена на Универзитету у Београду–Хемијском факултету. Решење број: 4-6/24). Протеини ће бити изоловани и пречишћени на Универзитету у Београду-Хемијском факултету, те ће се спектроскопске технике (UV/Vis, флуоресценција) и ЦД спектроскопија (енгл. *Circular dichroism, CD*) такође изводити на истој институцији. Термофореза на мулти-скали, МСТ (енгл. *Multiscale thermophoresis, MST*), ће бити урађена на Катедри за општу и неорганску хемију, Факултет фармације и биохемије, Свеучилиште у Загребу, Хрватска, за додатно појашњење везивних енергија ПФАС-ова за протеине од интереса. Поред тога, утицај везивања лиганда на биолошку функцију протеина биће одређен применом спектрофотометрије и куплованих ензимских есеја на Универзитету у Београду-Хемијском факултету.

6. Очекивани резултати:

У оквиру предложених истраживања, ова докторска дисертација ће испитати утицај везивања перфлуороалкилованих карбоксилних киселина (ТФА, ПФБА и ПФОА) за хумане протеине крви (фибриноген и алфа-2-макроглобулин). Анализа везивања ових молекула за поменуте протеине ослониће се на проучавање нековалентних интеракција у комплексу протеин-лиганд, укључујући водоничне везе, ван дер Валсове интеракције. Идентификација везивних места, кључних аминокиселина, везивних енергија и интеракција током везивања ТФА, ПФБА и ПФОА молекула допринеће бољем разумевању токсичности и биорасположивости ПФАС у људском организму. Очекује се да ће конформационе промене протеина бити детаљно анализиране и објашњене, са циљем истраживања структуре и функције хуманих протеина након везивања ових релативно малих лиганада. Такође се очекује да везивање лиганада може имати утицај на биолошку функцију протеина.

6. Литература:

1. Gaines, L. G. (2023). Historical and current usage of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A literature review. *American Journal of Industrial Medicine*, 66(5), 353-378.
2. Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Goldenman, G., Herzke, D., ... & Wangi, Z. An overview of the uses of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—Electronic supplementary information. *Environmental Science: Processes and Impacts* (Oct. 30, 2020) at, 50-51.
3. Al Amin, M., Sobhani, Z., Liu, Y., Dharmaraja, R., Chadalavada, S., Naidu, R., ... & Fang, C. (2020). Recent advances in the analysis of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—A review. *Environmental technology & innovation*, 19, 100879.
4. Brendel, S., Fetter, É., Staude, C., Vierke, L., & Biegel-Engler, A. (2018). Short-chain perfluoroalkyl acids: environmental concerns and a regulatory strategy under REACH. *Environmental Sciences Europe*, 30, 1-11.
5. Ateia, M., Maroli, A., Tharayil, N., & Karanfil, T. (2019). The overlooked short-and ultrashort-chain poly-and perfluorinated substances: A review. *Chemosphere*, 220, 866-882.
6. Gagliano, E., Sgroi, M., Falciglia, P. P., Vagliasindi, F. G., & Roccaro, P. (2020). Removal of poly-and perfluoroalkyl substances (PFAS) from water by adsorption: Role of PFAS chain length, effect of organic matter and challenges in adsorbent regeneration. *Water research*, 171, 115381.
7. Salvalaglio, M., Muscionico, I., & Cavallotti, C. (2010). Determination of energies and sites of binding of PFOA and PFOS to human serum albumin. *The journal of physical chemistry B*, 114(46), 14860-14874.
8. Perera, N. D., Betancourt, J., Miksovskaja, J., & O'Shea, K. E. (2023). Detail study on the interaction between perfluorooctanoic acid (PFOA) with human hemoglobin (Hb). *Current research in toxicology*, 5, 100130.

9. Xu, M., Cui, Z., Zhao, L., Hu, S., Zong, W., & Liu, R. (2018). Characterizing the binding interactions of PFOA and PFOS with catalase at the molecular level. *Chemosphere*, 203, 360-367.
10. Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
11. Bandyopadhyay, D., Mohan, S., Ghosh, S. K., & Choudhury, N. (2014). Molecular dynamics simulation of aqueous urea solution: is urea a structure breaker?. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(40), 11757-11768.