

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације Александре Ђурђевић Ђелмаш, мастера биохемије.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 10. априла 2025. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење Извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидаткиње Александре Ђурђевић Ђелмаш (Број одлуке 281/2), мастера биохемије, пријављене под насловом:

„Примена молекулског моделовања и експерименталних метода у циљу проучавања утицаја перфлуоралкилованих супстанци на хумане протеине крви“.

На основу поднете и прикупљене документације, као и увида у досадашњи рад кандидаткиње, подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидату

Кандидаткиња Александра Ђурђевић Ђелмаш рођена је 21. октобра 1992. године у Шапцу. Основну школу „Уједињене нације“ завршила је у Београду као носилац Вукове дипломе. Средњу медицинску школу „Звездара“ је завршила 2011. године као одличан ученик. Основне академске студије је уписала 2011. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, одсек Биохемија, а студије је завршила у мају 2016. године са просечном оценом 8,39 (осам и 39/100). Завршни рад под насловом „Развој високо ефикасног ензимског есеја у микротитар плочама за одређивање активности целулазе 5а из *Trichoderma reesei* експримиране у *Saccharomyces cerevisiae*“ је одбранила са оценом 10 (десет). Исте године уписује мастер студије на Хемијском факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемија, те наредне године брани мастер рад под називом „Претрага библиотеке целулазних мутаната са повећаном активношћу добијених сатурационом мутагенезом помоћу целобиозодеhidрогеназног есеја“ оценом 10 (десет). Мастер академске студије је завршила са просечном оценом 9,80 (девет и 80/100).

Докторске академске студије је уписала 2017. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Биохемија. Током 2018. године је боравила као истраживач на Фраунхофер институту, Ахен, Немачка, као стипендиста ФЕБС програма за колаборацију за централну и источну Европу. Од октобра исте године је запослена на Институту за нуклеарне науке „Винча“, на пројекту ОИ 172045 Министарства просвете, науке и технолошког развоја који се односио на развој нових материјала за електролитичко добијање водоника и водоничне горивне ћелије. Наредне године наставља свој радни однос на Хемијском факултету као истраживач-приправник. Године 2020. прикључила се пројекту „Терапија РНК-вируса малим молекулима – Пренаменовање иминошећера и хлорокинских аналога против ковида 19 (SMART Repurposing)“, под бројем 7547552, финансираном од стране Фонда за науку Републике

Србије. Током докторских студија је учествовала у реализацији наставе на предметима Хемија природних производа (411A2), Регулација биохемијских процеса (403B2), Биохемија метаболизма (402B2) и Огледи у настави биохемије (435B2). Докторске академске студије на смеру Хемија, Хемијског факултета, Универзитет у Београду, уписује 2023. године.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Александра Ђурђевић Ђелмаш је коаутор три рада у врхунским међународним часописима (M21) и једног рада у истакнутом међународном часопису (M22). Коаутор је два саопштења на скуповима међународног значаја у штампаном изводу (M34). Библиографија докторанда, категорисана према Правилнику о стицању истраживачких и научних звања (Сл. гласник РС, бр. 159/2020-82), дата је у Прилогу 1 овог извештаја.

В. Образложење теме

1. Научна област: Хемија

2. Предмет рада

Предмет истраживања ове докторске дисертације ће бити усмерен на утицај перфлуоралкилованих киселина из групе перфлуоралкилованих супстанци, ПФАС (енгл. *Per- and polyfluoroalkyl substances, PFAS*), на хумане протеине крви. Одабрани протеини – фибриноген, хемоглобин, хумани серум албумин и алфа-2-макроглобулин, су од изузетног значаја за целокупну функционалност људског организма, с обзиром да имају важне улоге у коагулацији крви, транспорту молекула и јона, кисеоника и угљен-диоксида, односно, алфа-2-макроглобулин је универзална антипротеиназа. ПФАС су једињења којима је посвећена велика пажња у академском и индустријском свету, с обзиром да је показано да су неразградиви, а налазе се у пијаћој води и хуманој крви. Ова докторска дисертација има изузетан значај за разумевање метаболичког понашања ПФАС. Један део докторске дисертације ће бити посвећен рачунарским методама којима ће се доказивати везивање лиганда (ПФАС) за сва четири протеина, а други део ће бити посвећен експерименталним техникама којима ће се утврдити да ли долази до везивања лиганда, промене у активности, или пак, промени секундарне и терцијарне структуре протеина. Дозвола Етичке комисије за употребу хуманог биолошког материјала за истраживање Универзитета у Београду -Хемијског факултета (Решење број 4-6/24), приложена је као засебан прилог овог извештаја.

3. Научни циљ истраживања

У оквиру ове докторске дисертације формулисано је неколико циљева:

1. Оптимизација три лиганда перфлуоркарбоксилних киселина: ултракратколанчана трифлуорсирћетна киселина (ТФА); кратколанчана перфлуорбутанска киселина (ПФБА); дуголанчана перфлуороктанска киселина (ПФОА);
2. Припрема и моделовање протеинских структура (фибриноген, хемоглобин, хумани серум албумин и алфа-2-макроглобулин) за молекулски докинг и динамику;

3. Анализа резултата и идентификација аминокиселина које учествују у специфичним интеракцијама са лигандима;
4. Развој нове методологије за праћење параметара протеин-лиганд интеракција током молекулско динамичких симулација
5. Изоловање и пречишћавање протеина из хумане крви, уз потврду чистоће на протеинској електрофорези;
6. Утврђивање структурних и функционалних промена на протеинима приликом везивања различитих лиганда.

4. Методе истраживања

У току израде ове докторске дисертације биће коришћене следеће теоријске и експерименталне методе:

1. Квантно-хемијски прорачуни за одређивање параметара поља сила сва три лиганда;
2. Флексибилно-ригидни молекулски докинг за одређивање почетних места везивања три лиганда за протеине од интереса;
3. Молекулска динамика за прецизно одређивање везивних места лиганда у условима који симулирају физиолошке;
4. Молекулска динамика за симулацију конформационих и структурних промена протеина и одређивање утицаја везивања лиганда на наведене промене;
5. Развој нове методологије за праћење параметара протеин-лиганд интеракција током молекулско динамичких симулација;
6. Одређивање вредности слободне енергије везивања лиганда;
7. Хроматографске технике: гел-хроматографија за пречишћавање алфа-2-макроглобулина;
8. Биохемијске методе: спектрофотометријско одређивање концентрације протеина; електрофоретска анализа чистоће протеина (натријум додецил сулфат електрофореза у гелу полиакриламида, енгл. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*, *SDS PAGE*), спектрометрија циркуларног дихроизма протеина за одређивање промена у секундарној и терцијарној структури протеина, флуориметрија протеина за праћење протеин-лиганд интеракције у виду промене микроокружења ароматичних аминокиселина, есеји за одређивање протеинске активности као што су коагулациони есеј са тромбином за праћење функције фибриногена, флуориметријски есеј за праћење функције тромбина, есеј инхибиције трипсина за одређивање активности алфа-2-макроглобулина.

5. Актуелност проблематике

Пер- и полифлуоралкиловане супстанце представљају велику групу синтетских органских једињења која се користе од почетка 20. века [1]. Захваљујући својој хемијској стабилности и специфичним физичко-хемијским својствима, нашле су широку примену у различитим индустријама. Међутим, управо та стабилност доводи до њихове

перзистентности у животној средини и потенцијалне штетности по здравље људи и екосистеме [2].

Највећи део ПФАС чине перфлуоралкиловане киселине, међу којима се издвајају перфлуороване карбоксилне (ПФКК), сулфонске (ПФСК) и фосфатне киселине (ПФФК) [3]. Оне могу бити директно испуштене у животну средину или настати разградњом других ПФАС. Перфлуоркарбоксилне киселине, опште формуле $C_nF_{2n+1}COOH$, класификују се према дужини флуорованог ланца на ултра-кратколанчане, кратколанчане и дугочланчане. Представници ових група су, редом: трифлуорсирћетна киселина (ТФА), перфлуорбутанска киселина (ПФБА) и перфлуороктанска киселина (ПФОА) која се сматра најзначајнијом [3–5].

Дугогодишња употреба довела је до глобалног присуства ПФАС у свим сегментима животне средине. Иако је употреба неких „наследних“ (енгл. *legacy*) ПФАС ограничена прописима, попут ПФОА, они се и даље детектују у различитим медијумима. Истовремено, „нове“ (енгл. *emerging*) ПФАС (као што су ТФА и ПФБА) постављају додатне изазове због своје постојаности, токсичности и недовољно истраженог понашања у животној средини. Значајне концентрације ПФАС детектоване су и у људској крви, што изазива оправдану забринутост. Најчешће идентификована перфлуоркарбоксилна киселина у воденим системима, али и хуманој крви, је управо ПФОА чија концентрација прелази законску регулативу [6].

Иако се кратколанчани ПФАС користе као алтернатива дугочланчаним, због претпостављене мање токсичности и недостатка одговарајуће регулативе, показало се да се и они апсорбују у организму. Како се ПФАС не метаболишу, могу се детектовати у крви и различитим ткивима, обично у концентрацијама израженим у нанограмима по литру. Најчешће се акумулирају у јетри, а полуживот дугочланчаних једињења у организму износи од 2,3 до 5,4 године, што указује на неопходност континуираног праћења изложености [7].

Показано је да перфлуоралкиловане киселине (ПФАК) остварују интеракције са протеинима као што су хумани серум албумин, хемоглобин и каталаза, што утиче на њихову структуру и/или функцију [8–10]. До сада није утврђено везивање ПФАК за фибриноген и алфа-2 макроглобулин. Савремене технике рачунарске хемије, као што су молекулски докинг и молекулска динамика, у комбинацији са експерименталним методама, омогућавају идентификацију кључних аминокиселина и интеракција које одређују стабилност комплекса између ПФАС и протеина, као и утицај на структуру протеина и биолошку функцију.

6. Очекивани резултати

У оквиру предложеног истраживања, ова докторска дисертација бавиће се испитивањем интеракције перфлуоркарбоксилних киселина (ТФА, ПФБА и ПФОА) са хуманим протеинима крви – фибриногеном, хемоглобином, хуманим серумом албумином и алфа-2-макроглобулином. Циљ је да се анализом протеин-лиганд интеракција идентификују везивна места на протеину, кључне аминокиселине и енергије везивања. Такође, биће

развијена нова методологија за праћење протеин-лиганд интеракција анализом молекулско-динамичке трајекторије у условима неспецифичног везивања. Посебна пажња биће посвећена конформационим променама протеина након везивања ових малих лиганата, као и њиховом потенцијалном утицају на структуру и функцију самих протеина.

Ово истраживање ће допринети бољем разумевању механизма токсичности и биорасположивости ПФАС у људском организму.

7. Литература:

- [1] L.G.T. Gaines, Historical and current usage of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A literature review, *Am J Ind Med* 66 (2023) 353–378. <https://doi.org/10.1002/ajim.23362>.
- [2] J. Glüge, M. Scheringer, I.T. Cousins, J.C. Dewitt, G. Goldenman, D. Herzke, R. Lohmann, C.A. Ng, X. Trier, Z. Wang, An overview of the uses of per- And polyfluoroalkyl substances (PFAS), *Environ Sci Process Impacts* 22 (2020) 2345–2373. <https://doi.org/10.1039/d0em00291g>.
- [3] R.C. Buck, J. Franklin, U. Berger, J.M. Conder, I.T. Cousins, P. De Voogt, A.A. Jensen, K. Kannan, S.A. Mabury, S.P.J. van Leeuwen, Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins, *Integr Environ Assess Manag* 7 (2011) 513–541. <https://doi.org/10.1002/ieam.258>.
- [4] M. Ateia, A. Maroli, N. Tharayil, T. Karanfil, The overlooked short- and ultrashort-chain poly- and perfluorinated substances: A review, *Chemosphere* 220 (2019) 866–882. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.186>.
- [5] M. Al Amin, Z. Sobhani, Y. Liu, R. Dharmaraja, S. Chadalavada, R. Naidu, J.M. Chalker, C. Fang, Recent advances in the analysis of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—A review, *Environ Technol Innov* 19 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100879>.
- [6] R.A. Brase, E.J. Mullin, D.C. Spink, Legacy and emerging per-and polyfluoroalkyl substances: Analytical techniques, environmental fate, and health effects, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms22030995>.
- [7] E. Gagliano, M. Sgroi, P.P. Falciglia, F.G.A. Vagliasindi, P. Rocco, 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 Res* 171 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115381>.
- [8] M. Salvalaglio, I. Muscionico, C. Cavallotti, Determination of energies and sites of binding of PFOA and PFOS to human serum albumin, *Journal of Physical Chemistry B* 114 (2010) 14860–14874. <https://doi.org/10.1021/jp106584b>.

- [9] J.B.J.M.K.E.O. N.L. Dilani Perera, Detail study on the interaction between perfluorooctanoic acid (PFOA) with human hemoglobin (Hb) , Current Research in Toxicology (2023). <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2023.100130>
- [10] M. Xu, Z. Cui, L. Zhao, S. Hu, W. Zong, R. Liu, Characterizing the binding interactions of PFOA and PFOS with catalase at the molecular level, Chemosphere 203 (2018) 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.200>.

Г. ЗАКЉУЧАК

Комисија сматра да се предложена истраживачка тема одликује савременим истраживачким трендовима и научном релевантношћу, те да очекивани резултати могу дати значајан допринос развоју научних сазнања у области хемије. Комисија сматра да кандидат задовољава све услове потребне за приступ изради докторске дисертације на Универзитету у Београду - Хемијском факултету и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да кандидаткињи Александри Ђурђевић Белмаш, мастер биохемичару, одобри израду докторске дисертације под насловом:

„Примена молекулског моделовања и експерименталних метода у циљу проучавања утицаја перфлуоралкилованих супстанци на хумане протеине крви“.

Предлажемо за ментора др Милоша Милчића, ванредног професора Универзитета у Београду - Хемијског факултета. Списак радова предложеног ментора, из којих се може видети да испуњава услове из Стандарда за акредитацију студијских програма докторских студија, дат је у Прилогу 2 овог извештаја.

У Београду, 25. априла 2025.

Комисија:

др Милош Милчић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Маја Груден-Павловић, редовни професор

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Марио Златовић, редовни професор

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Милан Николић, ванредни професор

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Карла Милчић, научни сарадник

Универзитет у Београду – Институт за хемију, технологију и металургију

Прилог 1

Библиографија кандидаткиње, категорисана према Правилнику о стицању истраживачких и научних звања (Сл. Гласник РС, бр 169/2020-82).

Врхунски међународни часописи (M21)

Ilić Đurđić K, Ostafe R, Đurđević-Đelmaš A, Popović N, Schillberg S, Fischer R, Prodanović R. Saturation mutagenesis to improve the degradation of azo dyes by versatile peroxidase and application in form of VP-coated yeast cell walls. *Enzyme Microb Technol.* 2020; 136:109509. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109509>. ИФ=3,553 (2018). Поље истраживања: Биотехнологија и примењена микробиологија 45/162 (2018) ISSN: 0141 0229

Ilić Đurđić K, Ostafe R, Đurđević-Đelmaš A, Popović N, Schillberg S, Fischer R, Prodanović R. Improved degradation of azo dyes by lignin peroxidase following mutagenesis at two sites near the catalytic pocket and the application of the peroxidase-coated yeast cell walls. *Front Environ Sci Eng.* 2021; 15:19. <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1311-4>. ИФ=6,048 (2021) Поље истраживања: Науке о животној средини 70/279 (2021) ISSN: 2095-2201

Ferjancic Z, Bihelovic F, Vulovic B, Matovic R, Trmcic M, Jankovic A, Pavlovic M, Djurkovic F, Prodanovic R, Djurdjevic Djelmas A, Kalicanin N, Zlatovic M, Sladic D, Vallet T, Vignuzzi M, Saicic RN. Development of iminosugar-based glycosidase inhibitors as drug candidates for SARS CoV-2 virus via molecular modelling and in vitro studies. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2023;39(1). <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2289007>. ИФ=5,6 (2023) Поље истраживања: Биохемија и молекуларна биологија 53/285 (2023) ISSN:1475-6366

Истакнути међународни часописи (M22)

Chen A, Zhang XD, Đelmaš AĐ, Weitz DA, Milcic K. Systems and methods for continuous evolution of enzymes. *Chem Eur J.* 2024;30(43): e202400880. <https://doi.org/10.1002/chem.202400880>. ИФ= 3,9 (2023) Поље истраживања: Хемија, мултидисциплинарна 68/175 (2023) ISSN :0947-6539

Научна саопштења на скуповима међународног значаја штампана у изводу (M34)

Crnoglavac, M, Stančević, I, Đurđević-Đelmaš A, Ilić Đurđić, K, Prodanović R. “Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressed in periplasmic and intracellular space of *E. coli*”, IX BDS conference: Diversity in Biochemistry, Belgrade, Serbia November, 14-16, 2019. p.103.

Aleksandra Đurđević Đelmaš, Karla Milčić, Miloš Milčić. “Docking analysis of the PFAAs interaction with human fibrinogen“, International conference on noncovalent interactions (ICNI III), Belgrade, Serbia, June 17-21, 2024.

Прилог 2

Спискови радова предложених ментора објављених у научним часописима са Science Citation Index (SCI) листе који квалификују менторе за вођење докторске дисертације.

Према Scopus бази: укупан број цитата без аутоцитата: 1176 (Хиршов индекс 18).

Име и презиме ментора: др Милош Милчић,

Звање: ванредни професор

Изабрани радови предложеног ментора:

1. Šunderić, M., Gligoriјеvić, N., Milčić, M., Minić, S., Nedić, O., & Nikolić, M. (2024). Phycocyanobilin is a new binding partner of human alpha-2-macroglobulin that protects the protein against oxidative stress. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 42(17), 8761-8771. 10.1080/07391102.2023.2248273
2. Šunderić, M., Vasović, T., Milčić, M., Miljević, Č., Nedić, O., Nikolić, M. R., & Gligoriјеvić, N. (2021). Antipsychotic clozapine binding to alpha-2-macroglobulin protects interacting partners against oxidation and preserves the anti-proteinase activity of the protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 502-512. 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.155
3. Minic, S. L., Milcic, M., Stanic-Vucinic, D., Radibratovic, M., Sotiroudis, T. G., Nikolic, M. R., & Velickovic, T. Č. (2015). Phycocyanobilin, a bioactive tetrapyrrolic compound of blue-green alga *Spirulina*, binds with high affinity and competes with bilirubin for binding on human serum albumin. *Rsc Advances*, 5(76), 61787-61798. <https://doi.org/10.1039/C5RA05534B>
4. Al-Hanish, A., Stanic-Vucinic, D., Mihailovic, J., Prodic, I., Minic, S., Stojadinovic, M., ... & Velickovic, T. C. (2016). Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Food Hydrocolloids*, 61, 241-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.012>
5. Minic, S., Stanic-Vucinic, D., Radomirovic, M., Radibratovic, M., Milcic, M., Nikolic, M., & Velickovic, T. C. (2018). Characterization and effects of binding of food-derived bioactive phycocyanobilin to bovine serum albumin. *Food Chemistry*, 239, 1090-1099. 10.1016/j.foodchem.2017.07.066