

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ФАКУЛТЕТА ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

**Предмет: Извештај комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата
Александре Павићевић, мастер физикохемичара**

Одлуком Наставно-научног већа Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду са X редовне седнице, одржане 6.7.2018. године именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата мастер физикохемичара Александре Павићевић, под насловом:

**„Примена електронске парамагнетне резонантне спектроскопије за испитивање
конформационих промена албумина методом спинског обележавања“**

Израда докторске дисертације под наведним насловом одобрена је одлуком Наставно-научног већа са II редовне седнице, одржане 9.11.2017. године. На основу те одлуке, Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној 30.11.2017. године дало сагласност да се прихвати предложена тема докторске дисертације.

На основу прегледа и анализе докторске дисертације кандидата, подносимо Наставно-научном већу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

A. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација мастер физикохемичара Александре Павићевић написана је на укупно 133 стране и у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду. Састоји се из следећих целина: Увод (4 стране), Преглед литературе (37 страна), Материјали и методе (10 страна), Резултати и дискусија (55 страна), Закључак (4 стране), Литература – 156 навода (17 страна). Кандидат је уз текст докторске дисертације приложио следеће: Биографију аутора (1 страна), Списак објављених научних радова из докторске дисертације (1 страна),

Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије тезе (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

Дисертација садржи укупно 44 слике (од тога је 18 слика из литературе, а 26 слика представља властите резултате) и 7 табела (од којих 6 представља властите резултате, а у једној су сумирани литературни подаци).

У поглављу *Увод* наведена су основна својства и функције серумског албумина, а такође је описана и актуелност испитивања серумског албумина помоћу спинског обележавања и електронске парамагнетне резонантне спектроскопије (ЕПР). У оквиру овог поглавља су у посебном потпоглављу представљени предмет и циљ дисертације.

Поглавље *Преглед литературе* је подељено на три главна дела. У првом делу су описани значај, структура и функције серумског албумина, са посебним освртом на хумани (ХСА, од енг. *Human Serum Albumin*) и говеђи серумски албумин (БСА, од енг. *Bovine Serum Albumin*), с обзиром на то да су ове две врсте албумина проучаване у оквиру ове дисертације. Такође су описана места везивања масних киселина и лекова на ХСА. У другом делу, објашњене су основе електронске парамагнетне резонантне спектроскопије (ЕПР), при чему су приказани физички принципи ове технике, образложено је како поједини инструментални параметри и својства узорка (хиперфино цепање и анизотропија) утичу на облик ЕПР спектра. У трећем делу је описано како се протеини могу проучавати спинским обележавањем и ЕПР спектроскопијом и наведено је какве се све врсте информација о испитиваном протеину могу добити овом методом. У оквиру овог дела, дат је и детаљан преглед литературних података који се односе на примену спинског обележавања ХСА и БСА доксил-стеаратима (ДС) и 3-малеимидо-проксилем (5-МСЛ) за проучавање ове две врсте албумина.

Поглавље *Материјали и методе* је подељено на пет главних делова. У првом делу су наведене све хемикалије које су коришћене у експерименталном раду. Други део се односи на припрему узорака ХСА, који се обележава помоћу 5-доксил-стеаринске (5-ДС) и 16-доксил-стеаринске киселине (16-ДС), док је у трећем делу описана процедура обележавања БСА 5-МСЛ обележивачем и припреме узорака БСА. Детаљи снимања узорака ХСА и БСА ЕПР спектрометром су дати у четвртном делу, док је у петом делу приказана процедура за разлагање добијених ЕПР спектра у два софтверска пакета која су намењена компјутерским симулацијама ЕПР спектра.

Поглавље *Резултати и дискусија* је подељено у три главне целине. У оквиру прве целине приказани су резултати који се односе на оптимизацију услова инкубације

обележивача 5-ДС и 16-ДС са ХСА и карактеризације места везивања ДС за ХСА. У овом делу дисертације испитана је и конкуренција између 5-ДС и 16-ДС при везивању за ХСА, као и близина доксил групе ДС обележивача (везаног за ХСА) површини ХСА. Друга целина приказује детаљну анализу места везивања 5-МСЛ за БСА. Трећа целина уједно представља главни део ове дисертације, и приказује како варирање температуре и рН, додавање етанола, везивање масних киселина и лекова, и оксидативна оштећења утичу на конформацију ХСА и БСА, при чему су конформационе промене ХСА проучаване помоћу ДС обележивача, док је у те сврхе БСА обележаван са 5-МСЛ.

У поглављу **Закључак** су сумирани сви резултати и закључци који су протистекли из ове дисертације.

Б. Опис резултата дисертације

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације организовани су у три дела. У првом делу дисертације, на првом месту су испитани оптимални услови за инкубацију ХСА са 5-ДС и 16-ДС, тако да се постигне максимално везивање ових обележивача за ХСА. Утврђено је да се максимално везивање ДС за ХСА постиже после 30 минута од мешања ових супстанција, као и да није неопходно да се узорци припремају на физиолошкој температури (37 °C), већ је довољно да се инкубација ради на собној температури (22 °C). Затим су окарактерисана места везивања 5-ДС и 16-ДС за ХСА посматрањем ширине ЕПР спектра, при чему је утврђено да се доксил група 5-ДС налази у хидрофобној унутрашњости ХСА, док је у случају 16-ДС ова група лоцирана близу површине молекула ХСА. Компјутерским симулацијама ЕПР спектра, добијених за различите [ДС]:[ХСА] моларне односе, утврђено је да се ЕПР спектри 5-ДС и 16-ДС везаних за ХСА састоје из три главне компоненте које одговарају јако (ЈВ), слабо везаном (СВ) и невезаном (НВ) обележивачу. Како би се утврдило да ли се 5-ДС и 16-ДС везују за иста места на ХСА, урађени су експерименти у којима је ХСА инкубиран са мешама ова два обележивача. Конкуренцијом између 5-ДС и 16-ДС при њиховом везивању за ХСА, утврђено је да се при истовременом везивању ова два молекула за ХСА, повећава количина невезаног обележивача у односу на случај када се они појединачно везују за ХСА. При томе је утврђено да се при конкуренцији између 5-ДС и 16-ДС, 16-ДС везује за ХСА са већим афинитетом у односу на 5-ДС. Такође је испитивана околина доксил групе 5-ДС и 16-ДС у ХСА, тј.

колико је ова група близу површини ХСА, праћењем и анализом кинетике редукције ове групе аскорбинском киселином. У овим експериментима је потврђено постојање два типа места за везивање 5-ДС и 16-ДС за ХСА, и на још један начин је показано да је доксил група 16-ДС ближа површини молекула ХСА, у односу на 5-ДС чија је доксил група лоцирана у хидрофобној унутрашњости ХСА.

У оквиру друге целине детаљно су анализирани ЕПР спектри 5-МСЛ/БСА конјугата, при чему је утврђено да ови спектри могу да се разложе на две компоненте, ЈВ и СВ, при чему ЈВ потиче од 5-МСЛ везаног за цистеин на позицији 34 (Cys-34), док је за СВ детаљном анализом утврђено да се везује за аминок групе на површини БСА.

У трећој целини приказани су резултати добијени проучавањем конформационих промена ХСА и БСА индукованих варирањем температуре и рН, додавањем етанола, везивањем лиганда (масних киселина и лекова који се користе у свакодневној терапији) и излагањем дејству реактивних кисеоничних врста (H_2O_2 и $\cdot O_2^-$). Резултатима симулација је показано да повећање температуре, мењање рН вредности од физиолошке ка киселој и базној средини, додавање етанола, као и везивање масних киселина и лекова утичу на промене у расподели 5-ДС и 16-ДС у ХСА и то тако да се удео ЈВ компоненте смањује, а расту удели СВ и НВ компоненте. Насупрот томе, водоник-пероксид и супероксидни анјонски радикал нису утицали на промене у везивању 5-ДС и 16-ДС за ХСА.

Показано је да при одмотавању ХСА и БСА услед термалне денатурације при нижим температурама (до 50-60 °C) околина аминоксилних група сва три обележивача постаје флексибилнија. Са даљим повећањем температуре, околина аминоксилних група 5-ДС и 5-МСЛ везаног за Cys-34, лоцираних у хидрофобној унутрашњости албумина, постаје све ригиднија, а за 16-ДС и 5-МСЛ везан за аминок групе БСА, флексибилнија. На вишим температурама долази до делимично реверзибилних промена структуре албумина, таквих да хидрофобни цепои постају све затворенији, што је последица термалне агрегације, а са друге стране долази до одмотавања албумина на површини.

Мењање рН ка киселој или базној средини у односу на физиолошку (рН 7,4), коришћењем сва три обележивача, детектовано је као пораст у флексибилности албумина, што је последица одмотавања структуре албумина услед кисело-базних прелаза. У случају 5-МСЛ везаног за БСА, уочено је да кисело-базни прелази доводе не

само до отварања цепа у којем се налази Cys-34, већ за последицу имају и повећану покретљивост аминок група на површини БСА.

Додавањем етанола растворима ХСА и БСА, долази до разматавања албумина, што се у случају 5-ДС/ХСА и 5-МСЛ/БСА манифестује као смањење ширине ЕПР спектра услед повећане флексибилности околине ових обележивача. Такође, 5-МСЛ везан за аминок групе на површини БСА је показао повећану мобилност. Насупрот томе, ширина ЕПР спектра 16-ДС/ХСА се повећавала, што може да говори или о повећаној ригидности, или, што је вероватније, о повећаној поларности у околини доксил групе 16-ДС, која услед разматавања ХСА постаје изложенија растварачу.

Везивање пет масних киселина (лауринска, миристинска, палмитинска, стеаринска и цис-олеинска) је утицало на промену расподеле 5-ДС и 16-ДС у молекулу ХСА, али такође и на отварање цепа у којем је смештен Cys-34. Са друге стране везивање наведених масних киселина није утицало на околину аминок група на површини БСА.

Резултати који се односе на проучавање утицаја везивања шест лекова (ибупрофен, диазепам, варфарин, рамиприл, бормазепам и диклофенак) за ХСА и БСА на конформацију ових протеина, указују не само на измењену расподелу 5-ДС и 16-ДС у ХСА, већ говоре и о промени околине Cys-34 у присуству лекова. Везивање ибупрофена, бромазепама, рамиприла и диклофенака за 5-МСЛ/БСА је доводило до повећања флексибилности околине Cys-34, док су рамиприл и диазепам испољавали супротан ефекат. Резултати добијени у оквиру ове дисертације су у сагласности са бројем места везивања у албумину за сваки од ових лекова. Такође, није пронађена корелација између промена у ЕПР спектарима 5-ДС/ХСА, 16-ДС/ХСА и 5-МСЛ/БСА и места везивања лекова, што указује на то да структурне промене у албумину потичу на првом месту од оријентације лека и интеракција са одређеним местом везивања.

Водоник-пероксид и супероксидни анијонски радикал при коришћеним концентрацијама нису изазвали промене капацитета албумина за везивање масних киселина, али су довели до оксидативних оштећења која се испољавају кроз отварање Cys-34 цепа, повећање мобилности аминок група на површини албумина, као и кроз оксидацију ових група.

В. Упоредна анализа резултата дисертације са резултатима из литературе

Серумски албумини (СА) су глобуларни протеини, који се синтетишу у јетри кичмењака одакле се излучују у крвоток, где чине 60 % укупног протеинског садржаја плазме. Ови протеини имају неколико важних функција у физиолошким условима: транспортну, антиоксидативну, имају улогу у сигнализацији и вазодилатацији, чине око 80 % колоидног осмотског притиска, а доприносе и одржавању рН вредности крви. Због овако великог значаја албумина, он је један од највише изучаваних протеина. За испитивање његове структуре, конформационих промена и интеракција са различитим супстанцијама коришћено је обиље разних техника, међу којима је и електронска парамагнетна резонантна спектроскопија (ЕПР). Како би албумин могао да се испитује помоћу ЕПР-а, за њега се најпре везује спински обележивач, парамагненти молекула, који садржи неспарен електрон, чији се сигнал детектује помоћу ЕПР-а. Спински обележивачи су осетљиви на поларност, протичност и вискозност средине, као и на смањену покретљивост, што се све манифестује у изгледу ЕПР спектра.

С обзиром на транспортну функцију албумина углавном су за спинско обележавање ХСА и БСА, коришћени деривати масних киселина и то претежно стеаринске киселине. Код ових масних киселина је парамагнетна доксил група ковалентно везана за неки од угљеникових атома у метиленском низу. Међу њима су најчешће коришћене две доксил-стеаринске киселине код којих се доксил група налази на супротним крајевима метиленског ланца – 5-доксил-стеаринска киселина (5-ДС) и 16-доксил-стеаринска киселина (16-ДС). Осим тога, за проучавање албумина је у литератури коришћен и 3-малеимида проксил (5-МСЛ) који се у албумину ковалентно везује за Cys-34.

У литератури је показано да је доксил група 5-ДС везаног за ХСА или БСА јаче имобилисана у односу на 16-ДС [1–6]. Такође је нађено да се доксил група 5-ДС у албумину налази у хидрофобној унутрашњости овог протеина, док се у случају 16-ДС налази близу површине [2,5,7–9]. Осим тога, за 16-ДС је утврђено да се при везивању за ХСА дистрибуира на неколико различитих места, тј. да молекули 16-ДС могу релативно брзо да се крећу унутар албумина и измеђују места [10]. У овом раду је показано да компјутерским симулацијама ЕПР спектри 16-ДС/ХСА комплекса могу да се разложе на компоненте које одговарају јако (ЈВ) и слабо везаном (СВ) обележивачу. Овакви подаци нису доступни за 5-ДС/ХСА комплекс. Сви наведени

подаци су у сагласности са резултатима ове дисертације добијеним анализом и симулацијама ЕПР спектра 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА комплекса и кинетике редукције доксил група ових обележивача аскорбинском киселином. Симулацијама је у овој дисертацији показано да се и 5-ДС, као и 16-ДС у ХСА дистрибуира на два типа места – ЈВ и СВ, а одређени су и удели ЈВ, СВ и НВ (невезане) компоненте при тазличитим [ДС]:[ХСА] моларним односима за оба обележивача. Кинетика редукције доксил група ДС обележивача који се налазе у комплексу са ХСА аскорбинском киселином је праћена у студији других аутора, међутим резултати нису квантитативно анализирани, већ је на основу нагиба кинетичких кривих закључено да се доксил група 5-ДС налази дубље у унутрашњости ХСА у поређењу са 16-ДС [11]. У овој дисертацији је детаљном анализом кинетичких кривих и одређивањем кинетичких параметара потврђено да постоје два типа места везивања 5-ДС и 16-ДС за ХСА, која су у различитој мери изложена води. Како би се утврдило да ли се 5-ДС и 16-ДС везују за иста места на ХСА, у овој дисертацији су урађени експерименти у којима је ХСА инкубиран са смешама ова два обележивача, при чему је утврђено да се истовременим везивањем ова два молекула за ХСА, повећава количина неvezаног обележивача у односу на случај када се они појединачно везују за ХСА. Анализом ЕПР спектра је утврђено да се при конкуренцији између 5-ДС и 16-ДС, 16-ДС везује за ХСА са већим афинитетом у односу на 5-ДС. У литератури не постоје подаци о конкуренцији између ова два обележивача при везивању за ХСА. Међутим, постоји студија у којој су приказани резултати конкуренције између 5-ДС, 10- (10-ДС) и 12-доксил-стеаринске (12-ДС) киселине при везивању за ХСА [12]. У овом раду [12] је показано да услед стерних сметњи између доксил група два различита ДС обележивача долази до појављивања значајне количине неvezаног обележивача у ЕПР спектрима, што се слаже са резултатима приказаним у овој дисертацији.

Када је у питању везивање 5-МСЛ обележивача за албумин, у литератури постоје две различите претпоставке у вези са пореклом СВ компоненте. Према једној претпоставци, ова компонента потиче од слободног 5-МСЛ у раствору [13], док према другом раду, СВ компонента одговара 5-МСЛ обележивачу везаном за аминокиселинску групу албумина [14]. У овој дисертацији је детаљном анализом ЕПР спектра 5-МСЛ/БСА коњулата показано да СВ компонента потиче од 5-МСЛ везаног за аминокиселинску групу на површини БСА.

У главном делу дисертације испитане су конформационе промене ХСА и БСА индуковане варирањем температуре и рН, додавањем етанола, везивањем лиганда

(масних киселина и лекова који се користе у свакодневној терапији) и излагањем дејству реактивних кисеоничних врста (H_2O_2 и $\cdot\text{O}_2^-$). У литератури постоје подаци о утицају температуре на мобилност 5-ДС, 16-ДС [2,6,10] и 5-МСЛ везаних за ХСА или БСА [13,15,16]. У овим радовима, термална денатурација албумина је праћена у ужем опсегу температура у односу на резултате приказане у овој дисертацији (22-75 °С), стога је у овој дисертацији успешно детектовано повећање ригидности хидрофобних цепова на температурама изнад 60 °С, што није забележено у литератури. Такође, у једном раду [10] приказани су удели ЈВ и СВ компонената у ЕПР спектрима 16-ДС/ХСА на само три различите температуре – 22, 37 и 50 °С. Резултати који се односе на утицај температуре на мобилност 5-ДС, 16-ДС и 5-МСЛ обележивача и уделе ЈВ и СВ компонената добијени у овој дисертацији се слажу са претходно наведеним литературним изворима при нижим температурама.

Утицај рН на ХСА и БСА је веома слабо проучаван помоћу ДС и 5-МСЛ обележивача. Наиме, у једном раду приказани су удели ЈВ и СВ 16-ДС/ХСА комплекса на три рН вредности (5,5, 7,4 и 8,5) [10], а у другом раду је одређена количина везаног 12-ДС обележивача за БСА у опсегу рН 5,0-11,0 [17]. Кисело-базни прелази БСА су проучавани помоћу малеимида-аминосилних деривата различите дужине молекула у опсегу рН 2,0-10,0 [18,19], међутим резултати за 5-МСЛ нису приказани, с обзиром на тврдњу аутора да 5-МСЛ није довољно осетљив за детекцију рН-прелаза албумина. Резултати приказани у овој дисертацији обухватају приказ утицаја рН на мобилност аминоксилне групе 5-ДС, 16-ДС и 5-МСЛ везаних за албумин, као и на уделе ЈВ, СВ и НВ компонената 5-ДС/ХСА и 16-ДС/ХСА (односно дистрибуцију 5-ДС и 16-ДС у ХСА при рН-прелазима). Ови резултати су у сагласности са постојањем пет форми албумина које постоје у различитим областима рН, и са чињеницом да при варирању рН од физиолошке вредности ка киселој или базној средини долази до разматавања структуре албумина [20]. Осим тога, у овој дисертацији је показано и како растворљивост 5-ДС и 16-ДС зависи од рН (о чему нема података у литератури), на основу чега је развијен оптималан поступак за испитивање ХСА помоћу ових обележивача у киселој средини.

Утицај етанола на конформационе промене ХСА и БСА је помоћу ЕПР технике испитан квалитативно у једном раду, у којем је показано да повећањем концентрације етанола долази до промена структуре ХСА, при чему расте количина невезаног 5-ДС обележивача [9]. Овакав тренд је показан и у овој дисертацији, а свеукупни резултати који се односе на утицај етанола на конформацију албумина се слажу са литературним

подацима у којима је забележено губљење секундарне и терцијарне структуре овог протеина са повећањем концентрације етанола [21].

Утицај везивања масних киселина на конформацију ХСА и БСА помоћу 5-ДС, 16-ДС и 5-МСЛ обележивача није приказан у литератури. Међутим, постоји неколико радова у којима је показано да постоји конкуренција између доксил-деривата масних киселина различитих дужина и различитих необележених масних киселина при везивању за ХСА и БСА [3,22–24]. У овим радовима конкуренција између масних киселина и ДС обележивача није детаљно изучавана, него је послужила само да се испита да ли се доксил-деривати масних киселина везују за иста места као и необележене масне киселине. Ови литературни подаци се слажу са резултатима добијеним у овој дисертацији. Такође, резултати ове дисертације показују да при везивању масних киселина долази до отварања џепа у којем се налази Cys-34, што се слаже са литературним подацима у којима је показано да се везивање масних киселина за албумин повећава реактивност Cys-34 према једињењима која се везују за сулфхидрилне групе [25].

Интеракција лекова који су део уобичајене терапије (ибупрофена, диазепама, варфарина, рамиприла, бромазепама и натријум-диклофенака) и албумина, према доступној литератури нису проучавани спинским обележавањем ХСА или БСА са доксил-стеаринским и 5-МСЛ обележивачима. Међутим, резултати показани у овој дисертацији се слажу са литературним подацима о броју места везивања ових лекова на албумину [26–31].

Прегледом доступне литературе нису пронађени радови у којима су конформационе промене ХСА или БСА услед оксидативних оштећења проучавани спинским обележавањем и ЕПР спектроскопијом. Смањење количине 5-МСЛ везаног за Cys-34, при третману ХСА и БСА водоник-пероксидом и калијум-супероксидом, уочено у оквиру овог дела дисертације се слаже са подацима да се Cys-34 у присуству реактивних кисеоничних врста споро оксидује до сулфенског, сулфинског или сулфонског облика [32].

- [1] D.F.H. Wallach, S.P. Verma, E. Weidekamm, V. Bieri, *Biochim. Biophys. Acta* 356 (1974) 68–81.
- [2] J.D. Morrisett, H.J. Pownall, A.M. Gotto, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 2487–2494.
- [3] H. Heinrich Ruf, M. Gratzl, *Biochim. Biophys. Acta* 446 (1976) 134–142.
- [4] T.G. Gantchev, M.B. Shopova, *Biochim. Biophys. Acta* 1037 (1990) 422–434.

- [5] V.A. Livshits, D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta* 1466 (2000) 350–360.
- [6] V. Muravsky, T. Gurachevskaya, S. Berezenko, K. Schnurr, A. Gurachevsky, *Spectrochim. Acta. A.* 74 (2009) 42–47.
- [7] S.J. Rehfeld, D.J. Eatough, W.Z. Plachy, *J. Lipid Res.* 19 (1978) 841–849.
- [8] M.J.N. Junk, H.W. Spiess, D. Hinderberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 8755–8759.
- [9] Y. Akdogan, M.J.N. Junk, D. Hinderberger, 12 (2011) 1072–1079.
- [10] A. Gurachevsky, E. Shimanovitch, T. Gurachevskaya, V. Muravsky, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360 (2007) 852–856.
- [11] J.M.K. Slane, C.-S. Lai, J.S. Hyde, *Magn. Reson. Med.* 3 (1986) 699–706.
- [12] C.B. Berde, B.S. Hudson, R.D. Simoni, L.A. Sklar, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 391–400.
- [13] G. Benga, S.J. Strach, *Biochim. Biophys. Acta* 400 (1975) 69–79.
- [14] C.N. Cornell, R. Chang, L.J. Kaplan, *Arch. Biochem. Biophys.* 209 (1981) 1–6.
- [15] M. Pantusa, L. Sportelli, R. Bartucci, *Eur. Biophys. J.* 37 (2008) 961–973.
- [16] R. Wetzel, M. Becker, J. Behlke, H. Billwitz, S. Böhm, B. Ebert, H. Hamann, J. Krumbiegel, G. Lassmann, *Eur. J. Biochem.* 104 (1980) 469–478.
- [17] M. Ge, S.B. Rananavare, J.H. Freed, *Biochim. Biophys. Acta* 1036 (1990) 228–236.
- [18] C.N. Cornell, L.J. Kaplan, *Biochemistry (Mosc.)*. 17 (1978) 1750–1754.
- [19] C.N. Cornell, L.J. Kaplan, *Biochemistry (Mosc.)*. 17 (1978) 1755–1758.
- [20] T. Peters Jr., *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press: Copperstown, NY, 1995.
- [21] P. Taboada, S. Barbosa, E. Castro, M. Gutiérrez-Pichel, V. Mosquera, *Chem. Phys.* 340 (2007) 59–68.
- [22] C. Lagercrantz, M. Setaka, *Acta Chem. Scand. B.* 29 (1975) 397–398.
- [23] C. Lagercrantz, T. Larsson, H. Karlsson, M. Setaka, *Eur. J. Biochem. FEBS.* 83 (1978) 197–203.
- [24] R.C. Perkins, N. Abumrad, K. Balasubramanian, L.R. Dalton, A.H. Beth, J.H. Park, C.R. Park, *Biochemistry (Mosc.)*. 21 (1982) 4059–4064.
- [25] Y.A. Gryzunov, A. Arroyo, J.-L. Vigne, Q. Zhao, V.A. Tyurin, C.A. Hubel, R.E. Gandley, Y.A. Vladimirov, R.N. Taylor, V.E. Kagan, *Arch. Biochem. Biophys.* 413 (2003) 53–66.
- [26] T. Kosa, T. Maruyama, M. Otagiri, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1607–1612.
- [27] U. Kragh-Hansen, *Biochem. J.* 209 (1983) 135–142.

- [28] F.G. Larsen, C.G. Larsen, P. Jakobsen, R. Brodersen, Mol. Pharmacol. 27 (1985) 263–270.
- [29] J. Shi, D. Pan, M. Jiang, T.-T. Liu, Q. Wang, J. Photochem. Photobiol. B. 164 (2016) 103–111.
- [30] T. Maruyama, M.A. Furuie, S. Hibino, M. Otagiri, J. Pharm. Sci. 81 (1992) 16–20.
- [31] Y. Zhang, P. Lee, S. Liang, Z. Zhou, X. Wu, F. Yang, H. Liang, Chem. Biol. Drug Des. 86 (2015) 1178–1184.
- [32] S. Carballal, R. Radi, M.C. Kirk, S. Barnes, B.A. Freeman, B. Alvarez, Biochemistry (Mosc.). 42 (2003) 9906–9914.

Г. Научни радови у којима су публиковани резултати из докторске дисертације

Радови у врхунским међународним часописима, M21:

1. **A. Pavićević**, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, G. Bačić, Binding of Doxyl Stearic Spin Labels to Human Serum Albumin: An EPR Study, The Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118(37), 10898-10905.

Радови у истакнутим међународним часописима, M23:

1. **A. Pavićević**, J. Luo, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin, European Biophysics Journal, 2017, 46(8), 773-787.

Д. Закључак комисије

На основу свега изложеног и оцене дате у Извештају, Комисија сматра да резултати кандидаткиње Александре Павићевић представљају оригиналан и значајан научни допринос у области биофизичке хемије. У складу са тим, Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета за физичку хемију, Универзитета у Београду да докторску дисертацију Александре Павићевић под насловом: **„Примена електронске парамагнетне резонантне спектроскопије за**

испитивање конформационих промена албумина методом спинског обележавања“, прихвати и одобри њену одбрану, чиме би били испуњени сви услови да кандидат стекне звање доктора физичкохемијских наука.

У Београду, 7.8.2018. године.

Чланови Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације

Др Милош Мојовић, ванредни професор
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

Др Ана Поповић-Бијелић, ванредни професор
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

Др Маријана Петковић, научни саветник
Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду