

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Ivan D. Pavićević

**Promene reaktivnosti tiolne grupe Cys34
humanog serum-albumina pri vezivanju
masnih kiselina *in vitro* i u karbonilnom
stresu**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Ivan D. Pavićević

**Changes in the reactivity of human serum
albumin Cys34 thiol group during fatty acids
binding *in vitro* and in carbonyl stress**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Mentor:

dr Ljuba Mandić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi Komisije za odbranu:

dr Ljuba Mandić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Miroslav M. Vrvić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Vesna Dimitrijević-Srečković,
redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske teze:

Veliku zahvalnost dugujem profesorki Ljubi Mandić, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, za pomoć tokom izrade teze, počevši od prvih optimizacija eksperimenata, pisanja naučnih radova, do konačnog sastavljanja teksta koji sledi. Pomoć i razumevanje koji su značajno iznad akademske komunikacije. Lepa slučajnost je da je 2017. godina u kojoj privodim kraju doktorske studije 20 godina udaljena od 1997. godine kada sam pomoću udžbenika hemije profesorke Mandić počeo formalno hemijsko obrazovanje. To doba je bilo sjajno.

Ljubav prema hemiji kao nauci je još starija od tog doba, jer sam mnogo pre početka škole dosta vremena provodio u školskoj laboratoriji srednje škole u kojoj je moj tata radio kao profesor hemije i bio okružen izobiljem hemijske literature. Laboratorijski rad mi je postao nezamenljivi deo svakodnevnice. Rečima neopisivu zahvalnost dugujem roditeljima Dragiši i Snežani i sestri Ivani koji me sve vreme podržavaju na ovom putu. Podrška koju dobijam i od buduće supruge Marije koja čini moj svet mogućim i realnim.

Zahvalnost izražavam i koleginicama i kolegama iz laboratorije 403 i saradnicima profesorke Mandić koji su ravnopravno doprineli izradi teze, kreativnim konsultacijama, ustupanjem opreme, hemikalija i uzoraka (u više slučajeva i sami su bili uzorci dajući krv za formiranje kontrolne grupe). Nabrojanjem imena uvek rizikujemo da propustimo neko drago ime, pa i pored tog rizika izdvojio bih Jasminku, Borisa, Jelenu, Vesnu, Anu, Ivanu, Bojana, Tamaru, Jovana.

Članovima komisije profesoru Miroslavu Vrviću i profesorki Vesni Dimitrijević Srećković zahvaljujem na interesovanju i praćenju teme. Profesore veoma cenim kao eksperte i poštujem kao predavače, profesora Vrvića kao profesora sa osnovnih i poslediplomskih studija, a profesorku Dimitrijević Srećković preko autorskih tekstova koji prate naučne aspekte zdrave ishrane.

Prošlo je više od godinu dana otkada radim u Gradskom zavodu za javno zdravlje u Beogradu. Ovo je jedinstvena prilika da se zahvalim i kolegama sa posla. Zavod ima sjajan kolektiv i drago mi je što sam deo tog tima.

Jelena R, specijalnu zahvalnost dugujem tebi, jer si mi, kao i više puta do sada, skrenula pažnju da vreme mnogo brže prolazi od moje percepcije te dimenzije. Uozbiljio sam se i napisao tezu, iako sam probio rokove iz onog češkog kalendara.

Zahvaljujem i Vama dragi čitaocē što ste spremni da izdvojite vreme i pročitate čime sam se to bavio prethodnih godina.

Promene reaktivnosti tiolne grupe Cys34 pri vezivanju masnih kiselina za humani serum-albumin *in vitro* i u karbonilnom stresu

Apstrakt. Humani serum albumin (HSA) je najzastupljeniji protein plazme sa udelom od oko 50 do 60 % svih proteina plazme. Vezuje i transportuje mnoge endogene i egzogene molekule, i doprinosi antioksidativnom kapacitetu seruma jer na površini molekula poseduje jednu slobodnu tiolnu grupu ostatka Cys34. Slobodne masne kiseline (MK), koje transportuje HSA, i karbonilni stres mogli bi, kroz promenu reaktivnosti tiolne grupe, uticati na njen potencijal kao hvatača reaktivnih karbonilnih vrsta. Stoga su ciljevi ove teze bili: *in vitro* ispitivanje uticaja 1) vezivanja MK, različite dužine lanca i zasićenosti na (i) reaktivnost Cys34-SH grupe, (ii) njen potencijal kao hvatača reaktivnih α -oksoaldehida, tj. na stepen karbonilacije i (iii) reaktivnost tiolne grupe HSA karbonilovanog metilglioksalom (model-sistem za molekule HSA modifikovane u karbonilnom stresu); 2) vezivanja MK ribljeg ulja na reaktivnost Cys34-SH grupe (sagledavanje mogućnosti modulacije svojstava HSA pomoću suplemenata); 3) određivanje sadržaja Cys34-SH grupe, korelacija sa sadržajem HbA1c i glukoze u karbonilnim stresom; 4) određivanje reaktivnosti Cys34-SH grupe HSA izolovanog iz seruma dijabetičara i zdravih osoba; 5) razvijanje qTLC metode za određivanje sadržaja MK, vezanih za HSA, koji je izolovan iz realnih uzoraka.

Vezivanje MK (različite dužine lanca i zasićenosti: miristinske (MYR), palmitinske (PLM), stearinske (STE), oleinske (OLA), eikozapentenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA)) za HSA *in vitro*, dovodi do povećanja vrednosti konstanti brzine reakcije (k) Cys34 tiolne grupe (i DTNB) (k vrednosti kompleksa HSA-MK: od $14,58 \pm 0,19 \times 10^{-3}$ do $26,02 \pm 1,06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ u odnosu na k HSA: $7,52 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), odnosno njene reaktivnosti za 2 do 3,5 puta. STE i OLA ispoljavaju slične efekte na reaktivnost HSA-SH, a najjači efekat ispoljava polinezasićena EPA. Od zasićenih MK, najveća vrednost k dobijena je pri vezivanju MYR za HSA, što može biti posledica izuzetne komplementarnosti njenog molekula sa vezivnim mestima na molekulu HSA, koja najviše utiču na izloženost tiolne grupe rastvaraču. Između vrednosti konstanti brzine reakcije Cys34-SH, dobijenih pri vezivanju različitih MK, i izračunatih vrednosti dostupnosti Cys34 tiolne grupe rastvaraču nađen je visok stepen korelacije ($r=0,927$). Dakle, reaktivnost tiolne grupe ostatka Cys34 povezana je sa promenom konformacije

molekula HSA pri vezivanju MK, što je dokazano i snimanjem fluorescentnih spektara odmašćenog HSA i različitih HSA-MK kompleksa. Promena konformacije molekula HSA zavisi od tipa (dužine ugljovodoničnog niza i stepena nezasićenosti) i broja molekula MK vezanih za HSA.

Vrednost konstante brzine reakcije Cys34 tiolne grupe kompleksa HSA-MK ribljeg ulja je za 2,4 puta veća od konstante odmašćenog HSA, i nalazi se između vrednosti dobijenih za komplekse HSA-OLA i HSA-DHA. Polazeći od zastupljenosti MK u preparatu ribljeg ulja (37 % EPA, 32 % DHA, 8 % OLA, određene GC-MS metodom), i pretpostavljajući da je doprinos prosečnoj kinetičkoj konstanti aditivan, računski dobijena vrednost za kinetičku konstantu dobro se slaže sa eksperimentalno određenom vrednošću. Saznanje da reaktivnost Cys34 tiolne grupe zavisi od tipa MK vezane za HSA otvara mogućnosti modulacije njene reaktivnosti, odnosno kapaciteta kao antioksidanta i hvatača reaktivnih vrsta, unošenjem određenih MK kao suplemenata ishrani.

Pri karbonilaciji HSA metilgliksalom (MG) *in vitro*, tiolna grupa u kompleksima HSA-zasićene MK i HSA-OLA karboniluje se u većem stepenu (od 53 do 65%) u odnosu na -SH odmašćenog HSA (45%). U slučaju kompleksa HSA-EPA i HSA-DHA, kao i kompleksa sa MK izolovanim iz ribljeg ulja, dolazi do brzog i izrazitog pada sadržaja HSA-SH, te je određivanje stepena karbonilacije otežano. Dakle, potencijal HSA-SH grupe kao reaktivnih hvatača α -oksoaldehida raste pri vezivanju MK, a porast zavisi od vrste MK vezane za HSA.

Vezivanje MYR, PLM, STE i OLA za karbonilovani HSA (MG-HSA) dovodi do povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe (k vrednosti od 9,84 do 13,80 $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) u odnosu na odmašćeni karbonilovani MG-HSA (7,74 \pm 0,10 $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), ali je ono manje izraženo u odnosu na nekarbonilovane HSA-MK komplekse. Ovo je posledica dodatnih promena konformacije molekula HSA tokom reakcije karbonilacije amino- i gvuanidino-grupa ostataka amino-kiselina sa MG, što je potvrđeno: (1) PAG elektroforezom i spektrofluorimetrijskim merenjima i (2) izostankom odstupanja u vrednostima konstanti brzine (dobijenog pri vezivanju MK različite dužine lanca za HSA) pri njihovom vezivanju za karbonilovani MG-HSA. Povećanje vrednosti k korelira sa povećanjem dužine ugljovodoničnog niza MK u seriji MYR, PLM i STE. Vrednosti k , dobijene za SH-grupu kompleksa MG-HSA-STE i MG-HSA-OLA, gotovo

su jednake. Uprkos činjenici da je koncentracija MG (10 mmol/L), upotrebljena za karbonilaciju HSA *in vitro*, mnogo veća od koncentracije pri normalnim fiziološkim uslovima i u dijabetesu, može se zaključiti da molekuli HSA, sa vezanim masnim kiselinama i modifikovani metilglioksalom, još uvek imaju značajan potencijal kao hvatači MG, odnosno vezivanje MK dovodi do povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe. Kako je HSA najzastupljeniji protein plazme, Cys34 tiolna grupa doprinosi značajno antioksidativnom potencijalu plazme, jer učestvuje sa oko 80 % u ukupnoj koncentraciji tiola u plazmi. Stoga, smanjenje njene reaktivnosti u MG-HSA-MK kompleksima (karbonilovani HSA), u poređenju HSA-MK kompleksima (nemodifikovani HSA), može uticati na antioksidativni kapacitet slobodne Cys34 tiolne grupe.

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

Da bi se sa sigurnošću mogao proceniti uticaj MK, vezanih za HSA u realnim uzorcima (serumima osoba sa karbonilnim stresom i hiperlipidemijom), na reaktivnost Cys34 tiolne grupe razvijena je metoda pogodna za određivanje sadržaja vezanih MK. HSA je izolovan iz seruma taloženjem sa amonijum-sulfatom. Optimizovani su uslovi za isolvavanje i ekstrakciju MK iz HSA, kvantifikaciju MK pomoću qTLC, i razvijeno

je specifično softversko rešenje koje omogućava denzitometrijsku analizu skenirane TLC pločice. Metoda je precizna (RSD vrednosti: od 1,4 do 4,7 %) i tačna (rikaveri vrednosti od 97,2 do 102,5 %; slaganje vrednosti sadržaja MK određenih pomoću qTLC i GC). U odnosu na druge metode za određivanje odnosa MK/HSA potrebna je znatno manja količina uzorka, kraće vreme za izvođenje analize, metoda je manje tehnički zahtevna i jeftina, i zato pogodna za rutinski rad. U kliničkim laboratorijama može se primeniti za: određivanje molskog odnosa MK/HSA, kao parametra u dijagnostici/proceni faktora rizika kod patoloških stanja kod kojih odnos MK/HSA može da bude i iznad 6:1 (dijabetes, metabolički sindrom, kardiovaskularne promene); procenu sadržaja IMA (ishemijom modifikovanog albumina), ranog markera ishemije miokarda, koja se zasniva na vezivanju jona kobalta za albumin, a na koje može uticati vezivanje MK za HSA; evaluaciju procene antioksidativnog potencijala/oskidativnog stresa na osnovu sadržaja tiolne grupe Cys34 ostatka HSA molekula.

Naučni doprinos ove disertacije ogleda se u karakterizaciji promena na molekulu HSA, do kojih dolazi usled vezivanja MK različite dužine lanca i zasićenosti (*in vitro* i *in vivo*), i koje za posledicu imaju povećanje dostupnosti/izloženosti rastvaraču slobodne tiolne grupe ostatka Cys34, odnosno njene reaktivnosti i stepena karbonilacije. Dobijeni rezultati imaju značajne implikacije u predviđanju kapaciteta HSA kao antioksidanta i kao hvatača reaktivnih vrsta, i otvaranju mogućnosti modulisanja tog kapaciteta unošenjem određenih MK kao suplemenata ishrani. Dodatni doprinos ogleda se u optimizaciji precizne i tačne qTLC metode (sa softverskim rešenjem, koje omogućava denzitometrijsku analizu) za određivanje sadržaja MK vezanih za HSA, koja je jeftina, zahteva malu količinu uzorka, kratko vreme za izvođenje analize, i zato je pogodna za rutinski rad u kliničkoj praksi.

Ključne reči: albumin, vezivanje masnih kiselina, reaktivnost Cys34 tiolne grupe, karbonilacija proteina, metilglioksal, karbonilni stres, dijabetes, određivanje masnih kiselina vezanih za HSA, TLC, softversko rešenje za denzitometrijsku analizu slike

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Patobiohemija

UDK broj: 577

Changes in the reactivity of human serum albumin Cys34 thiol group during fatty acids binding *in vitro* and in carbonyl stress

Abstract. Human serum albumin (HSA) is the most abundant protein of human plasma, accounting for 50-60% of total plasma proteins. HSA binds and transport many endogenous and exogenous substances, and contributes to the antioxidative pool in serum because of Cys34 free thiol group on the surface of its molecule. Free fatty acids (FAs), transported by HSA, and carbonyl stress could influence, through changed reactivity of the thiol group, on its potential as the scavenger of the reactive carbonyl species. Therefore, the aims of this thesis were: *in vitro* examination of the influence 1) of different (in terms of chain length and saturation) FAs binding on the: (i) reactivity of the Cys34-SH group, (ii) its potential as the scavenger of the reactive α -oxoladehydes, and (iii) on the reactivity of the thiol group of HSA carbonylated with methylglyoxal (the model-system for HSA molecules modified during carbonyl stress); 2) of FAs from fish oil on the Cys34-SH group reactivity (overviewing the possibility of the modulation of the HSA scavenger properties with supplements); 3) determination of the Cys34-SH group content, correlation with the HbA1c and glucose level of persons with elevated carbonyl stress; 4) determination of the Cys34-SH group reactivity of the HSA isolated from the sera of diabetic patients and healthy persons; 5) development of qTLC method for determination of the FAs content, bound to the HSA, which was isolated from sera samples.

Binding of FAs of different chain lengths and saturation (myristic (MYR), palmitic (PLM), stearic (STE), oleic (OLA), eicosapentaenoic (EPE) and docosahexaenoic acid (DHA)) to the HSA *in vitro* resulting in increasing of the kinetics constant (k) of the Cys34 thiol group reaction (with DTNB)(k values for HSA-FAs complexes: from $14.58 \pm 0.19 \times 10^{-3}$ to $26.02 \pm 1.06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comparing to k of the HSA solely $7.52 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), i.e. its reactivity for 2 to 3.5 times. STE and OLA show similar effects to the HSA-SH reactivity, and the strongest effect shows polyunsaturated EPA. From saturated FAs binding to the HSA, the strongest effect shows MYR, and that could be explained with extremely good fitting of the MYR molecule to the HSA FAs binding pockets which has the most influences to the exposure/accessibility of the thiol group to solvent. Between the values of Cys34 thiol group reaction constants, after

binding of different FAs, and calculated accessibilities of the Cys34 thiol group to solvent, high correlation was found ($r=0.927$). Therefore, the reactivity of the Cys34 thiol group is connected with conformational changes of the HSA molecule during FAs binding, which is further proved with fluorescent spectra of the defatted HSA and different HSA-FA complexes. The conformational changes of the HSA molecule depends on the type (length of the carbon chain, and the unsaturation) and the number of FAs molecules bound per HSA molecule.

The value of the kinetics constant of the Cys34 thiol group of the HSA complex with FAs from fish oil is 2.4 times higher than k of the defatted HSA, and lies between values of HSA-OLA and HSA-DHA complexes. Considering the overall FAs composition of fish oil supplement (37% EPA, 32% DHA, 8% OLA, analyzed with GC-MS), and assuming that influence of each FA has additive effect on the kinetics constant in the HSA-FA complexes mixture, calculated value of the kinetics constant is in accordance with experimentally determined value. The fact that reactivity of the Cys34 thiol group depends on the type of FA bound to the HSA, opens possibilities for modulation of its reactivity, ie capacity as antioxidant and scavenger of reactive species, using specific FAs as food supplementation.

During the HSA carbonylation with methylglyoxal (MG) *in vitro*, the thiol group in complexes of HSA-saturated FA and HSA-OLA is carbonylated at greater extent (from 53 to 65%) comparing to the -SH of defatted HSA (45%). In the case of the HSA-EPA and HSA-DHA complexes, as well as HSA complexes with FAs isolated from fish oil, fast and prominent decreasing of the content of the HSA-SH was observed, thereby deteriorate determination of the degree of carbonylation. Thus the potential of the HSA-SH group as scavenger of the reactive α -oxoaldehydes increases after FAs binding, and the increment depends on the type of FA bound.

MYR, PLM, STE and OLA binding to the carbonylated HSA (MG-HSA) leads to increasing of Cys34 thiol group reactivity (k values from 9.84 to $13.80 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) comparing to defatted and carbonylated MG-HSA ($7.74 \pm 0.10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), but in lesser degree comparing to corresponding non-carbonylated HSA-FA complexes. This could be a consequence of further changes in the HSA molecule conformation after carbonylation of amino- and guanidino-groups from amino acids residues with MG, which was proved: (1) using PAG electrophoresis and spectrofluorimetric analyses, and

(2) with omission of the k values deviation, obtained after different FA (in terms of carbon chains lengths) binding to the HSA, when they bind to the carbonylated MG-HSA. Increase of the k values correlates with increasing in carbon chain length of FA in series MYR, PLM and STE. Values of the constants for SH-groups of the complexes MG-HSA-STE and MG-HSA-OLA are almost equal. Despite to the fact that MG concentration (10 mmol/L), used in the HSA carbonylation *in vitro*, was much above concentration under normal physiological conditions and in diabetes, it could be concluded that HSA molecules, with bound FAs and modified with methylglyoxal, still have significant potential as scavengers of MG, i.e. FA binding yields increasing reactivity of the Cys34 thiol group. As HSA is the most abundant plasma protein, the thiol group of the Cys34 contributes significantly to the antioxidant potential of plasma, because it participates with about 80% of the total thiol concentration in plasma. Thus, decreasing the reactivity of the thiol group in MG-HSA-FA complexes (carbonylated HSA) comparing to HSA-FA complexes (unmodified HSA), could influence to the antioxidant capacity of free Cys34 thiol group.

The influence of the FAs on the Cys34 thiol group properties as “scavenger” in persons under carbonyl stress, with diabetes and metabolic syndrome (n=16) was investigated determining the content of the Cys34 thiol group, FAs bound to the HSA, glucose, HbA1c and thiol group reactivity, and their comparison with the parameters of control group (n=7). Content of FAs (2.46 ± 0.42 mol FA/mol HSA), glucose (10.4 ± 4.3 mmol/L), and HbA1c ($9.2 \pm 2.1\%$) are statistically significantly ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.001$, resp.) higher than in control group (0.76 ± 0.37 mol FA/mol HSA; 5.2 ± 0.3 mmol/L; $5.1 \pm 0.4\%$, resp.). The mean value of the kinetics constant of the Cys34 reaction of HSA isolated from diabetic sera ($11.19 \pm 1.16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) is statistically significantly ($p < 0.001$) higher comparing to control group ($6.93 \pm 0.41 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), which is connected with elevated content of FAs (1.25 ± 0.27 mmol/L), and triglycerides (2.2 ± 1.3 mmol/L) in patients sera (control group: 0.39 ± 0.19 mmol/L, 1.1 ± 0.3 mmol/L, resp.). Between kinetics constant and molar ratio of FA/HSA, in patients group high correlation was detected ($\rho = 0.837$), and lesser in control group ($\rho = 0.400$). Using all obtained data, the conclusion is that FA binding to the HSA significantly contributes to the reactivity of the HSA Cys34 thiol group in serum, ie its potential as scavenger of reactive species.

Assessing the influence of FAs with great certainty, bound to the HSA in real samples (sera from patients with carbonyl stress and hyperlipidemia), on the reactivity of the Cys34 thiol group, lead to development of the method suitable for determination of bound FA content. The HSA was isolated from serum using ammonium sulfate precipitation method. The optimization included conditions for desalting and extraction of FAs from HSA, and quantification of FAs using qTLC. Specific software solution was developed in the R statistical framework which provides densitometric image analysis of scanned TLC plate. The method is precise (RSD from 1.4 to 4.7%), and accurate (with recoveries from 97.2 to 102.5%; comparable FA content determined with qTLC and GC). Comparing to the other methods for determination of FA/HSA ratio, the developed method uses less sample volume, has shorter analysis time, is less technically demanding, and therefore is usable for routine work. In clinical laboratories the method could be used for: determination of FA/HSA molar ratio as the diagnostic/prognostic parameter for risk assessment in pathologies in which FA/HSA ratio could overflow 6:1 (as diabetes, metabolic syndrom, cardiovascular diseases); assessment IMA (ischemia modified albumin) content, as the early marker of myocardial ischemia, which relies on the cobalt ion binding to the HSA, on which FA binding to HSA possibly influences; evaluation of assessment of antioxidative potential/oxidative stress based on the content of free thiol group of the Cys34 residue of the HSA molecule.

Scientific contribution of this dissertation reflects in characterization of the HSA molecule changes, produced with binding of FAs of different carbon chains lengths and saturation (*in vitro* and *in vivo*), and which results in increasing exposure/accessibility to solvent of the free thiol group from the Cys34 residue, i.e. its reactivity and degree of carbonylation. Obtained results have significant implications in predicting the capacity of the HSA as antioxidant and scavenger of reactive species, and opens possibilities of that capacity modulations using specific FAs as food supplement. Further contribution reflects in optimization of precise and accurate qTLC method (alongside with software solution for densitometric image analysis) for determination of content of FAs bound to the HSA (i.e. FA/HSA molar ratio), which is inexpensive, using small sample volume, has short run time for analysis, and thus is suitable for routine work in clinical laboratory.

Keywords: Albumin, Fatty acids binding, Cys34 thiol group reactivity, Protein carbonylation, Methylglyoxal, Carbonyl stress, Diabetes, TLC quantification of Fatty acids bound to HSA, Software solution for densitometric image analysis

Scientific field: Biochemistry

Scientific discipline: Patobiochemistry

UDK number: 577

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature	4
2.1. Biosinteza, razgradnja i uloga humanog serum-albumina.....	4
2.2. Struktura humanog serum-albumina.....	6
2.3. Vezivna mesta i ligandi koji se vezuju za humani serum-albumin.....	7
2.3.1. Vezivanje liganada na N-terminusu HSA	7
2.3.2. Vezivna mesta na subdomenima I i II	8
2.3.3. Subdomen III u vezivanju liganada	9
2.3.4. Centralni interdomenski procep.....	10
2.4. Masne kiseline u cirkulaciji	10
2.4.1. Patofiziološka stanja u kojima je povišen nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji.....	13
2.5. Mesta vezivanja masnih kiselina na molekulu humanog serum-albumina.....	15
2.5.1. Dodatna vezivna mesta za MK srednjeg i dugog lanca.....	22
2.6. Reaktivnost Cys34 tiolne grupe	22
2.7. Glikacija/karbonilacija humanog serum-albumina.	26
2.7.1. α -oksoaldehidi i karbonilacija proteina	27
2.7.2. Metilglioksal, štetni efekti i uklanjanje	30
2.7.3. Patološka stanja u kojima je karbonilacija HSA povećana	31
2.8. Pregled metoda za određivanje sadržaja masnih kiselina.....	32
3. Materijal i metode	33
3.1. Hemikalije i reagensi	33
3.2. Aparati	33
3.3. Metode	33
3.3.1. Priprema komercijalnog humanog serum-albumina za in vitro istraživanja	33
3.3.2. Izolovanje humanog serum-albumina iz seruma pacijenata.....	34
3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih proteina i sadržaja HSA.....	35
3.3.4. Određivanje sadržaja slobodne Cys34 tiolne grupe	37
3.3.5. Određivanje kinetičke konstante reakcije Cys34-SH sa DTNB-om	38
3.3.6. Izolovanje masnih kiselina iz preparata ribljeg ulja	39

3.3.7.	Ekstrakcija masnih kiselina iz kompleksa sa HSA i priprema za GC analizu	40
3.3.8.	Analiza metil-estara masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom	40
3.3.9.	Ekstrakcija masnih kiselina iz kompleksa sa HSA za analizu tankoslojnom hromatografijom.....	41
3.3.10.	Analiza masnih kiselina tankoslojnom hromatografijom.....	42
3.3.11.	Skeniranje TLC pločica i digitalna analiza slike denzitometrijskim proračunom.....	43
3.3.12.	Elektroforetska analiza	43
3.3.13.	Priprema uzoraka HSA za in vitro istraživanja	47
3.3.14.	Vezivanje masnih kiselina za odmašćeni HSA	49
3.3.15.	Priprema uzoraka HSA za reakciju karbonilacije metilglioksalom.....	49
3.3.16.	Određivanje stepena karbonilovanja HSA	50
3.3.17.	Priprema uzoraka HSA za ispitivanja na spektrofiorimetru.....	50
3.4.	Statistička obrada podataka.....	51
4.	Rezultati i diskusija	52
4.1.	Dostupnost/reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA	52
4.2.	Uticaj vezivanja masnih kiselina za humani serum-albumin na reaktivnost tiolne grupe Cys34	57
4.2.1.	Uslovi praćenja promene reaktivnosti Cys34 tiolne grupe.....	57
4.2.2.	Vezivanje masnih kiselina za HSA	60
4.2.3.	Određivanje konstanti brzine reakcije Cys34 tiolne grupe kompleksa HSA-MK sa DTNB-om	61
4.2.4.	Šta je uzrok promene reaktivnosti Cys34 tiolne grupe u kompleksima HSA-MK?	68
4.3.	Uticaj vezivanja masnih kiselina na karbonilaciju HSA-SH grupe metilglioksalom <i>in vitro</i>	74
4.3.1.	Stepen karbonilacije HSA-SH grupe metilglioksalom in vitro	75
4.4.	Određivanje sadržaja neesterifikovanih masnih kiselina vezanih za humani serum-albumin	84
4.4.1.	Ekstrakcija masnih kiselina sa HSA	85
4.4.2.	TLC masnih kiselina ekstrahovanih sa HSA.....	87
4.4.3.	Upotreba skenera u dobijanju digitalnog zapisa TL hromatograma pogodnog za dalju denzitometrijsku analizu.....	88
4.4.4.	Algoritam za denzitometrijsku analizu TLC pločica.....	89
4.4.5.	Bojenje razvijene TLC pločice, izvori i uklanjanje šuma	92

4.4.6.	Validacija metode	95
4.5.	Ispitivanje uticaja vezivanja masnih kiselina na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA izolovanog iz seruma pacijenata u karbonilnom stresu	99
4.5.1.	Određivanje sadržaja HSA Cys34-SH grupe kod osoba sa karbonilnim stresom	99
4.5.2.	Sadržaj masnih kiselina vezanih za HSA i reaktivnost Cys34 tiolne grupe kod osoba sa karbonilnim stresom	102
5.	Zaključak	109
6.	Literatura	114

Lista skraćenica

ACS	Acil-CoA sintaza
AGPAT	Acil-CoA:acilglicerol-3-fosfat aciltransferaza
ATGL	Adipozna triglicerid lipaza
CEC	Karboksietilcistein
CEL	Karboksietil-lizin
CMC	Karboksimetilcistein
CML	Karboksimetillizin
DAG	Diacilglicerol
DGAT	Diacilglicerol-aciltransferaza
DHA	Dokozaheksaenska kiselina
DOGDIK	Deoksiglukozon-imidazolsko umreženje
DOLD	Deoksiglukozon-lizin dimer
EPA	Eikozapentaenska kiselina
FATP	Proteinski transporter masnih kiselina (Fatty acids transport protein)
FcRn	Neonatalni Fc receptor
G	Glioksal
GALA	Glikoaldehid-lizin amid
GODIK	Glioksalimidazolonsko umreženje
GOLA	Glioksal-lizin dimer
Gp60	60-kDa glkoprotein– albondin
GPAT	Glicerol-3-fosfat-aciltransferaza
GSH	Glutation (redukovana forma)
HSA	Humani serum albumin
HSL	Hormon senzitivna lipaza
LPA	Lizofosfatidna kiselina
MAG	Monoacilglicerol
MAGL	Monoacilglicerol lipaza
MG	Metilglioksal
MK	Masna kiselina

MODIC	Metilglioksal-imidazolski kroslinking
MOLD	Metilglioksal-lizin dimer
MYR	Miristinska kiselina
OLA	Oleinska kiselina
PA	Fosfatidna kiselina
PLM	Palmitinska kiselina
STE	Stearinska kiselina
TAG	Triacilgliceroli
β 2m	Beta-2 mikroglobulinski laki lanac

1. Uvod

Humani serum albumin (HSA) vezuje i transportuje mnoge endogene supstance, od kojih je dominantan transport slobodnih masnih kiselina (MK). Vezivanje masnih kiselina srednjeg i dugog lanca za HSA doprinosi povećanju njihove koncentracije u cirkulaciji, budući da je rastvorljivost pomenutih masnih kiselina izuzetno niska u humanoj plazmi (Carter and Ho 1994, van der Vusse 2009). Molekul HSA poseduje sedam dobro definisanih mesta za vezivanje masnih kiselina srednjeg i dugog lanca, različitog afiniteta za različite masne kiseline (Cistola 1998, Curry, Mandelkow et al. 1998). U posebnim uslovima na molekulu HSA postoje i manje specifična mesta za koja se mogu vezati molekuli MK i time se ukupni broj molekula MK vezanih za jedan molekul HSA značajno povećava (Bhattacharya, Grune et al. 2000).

Molekul HSA poseduje 17 disulfidnih mostova i jednu slobodnu tiolnu grupu na ostatku Cys34 (Clerici, Colombo et al. 2014). U cirkulaciji zdravih osoba 70 – 80 % Cys34-SH je u redukovanoj formi. Uzimajući u obzir visoku koncentraciju HSA u plazmi (oko 0,6 mmol/L), evidentan je doprinos HSA antioksidativnom potencijalu u plazmi (zapravo, HSA-SH učestvuje sa oko 80 %, tj. oko 0,5 mmol/L, u ukupnoj koncentraciji tiola u plazmi) (Ogasawara, Mukai et al. 2007, Clerici, Colombo et al. 2014). U manjem obimu, od oko 2 – 5 %, u cirkulaciji se nalaze oksidovane forme Cys34 tiolne grupe, kao sulfinska (Cys34-SO₂H) i sulfonska (Cys34-SO₃H) kiselina (Turell, Botti et al. 2009, Alvarez, Carballal et al. 2010, Torres, Turell et al. 2012). Oksidovani oblici nastaju u cirkulaciji kao posledica reakcija tiolne grupe.

Više istraživanja je potvrdilo ulogu Cys34-SH grupe u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih, azotnih i karbonilnih vrsta u cirkulaciji tokom oksidativnog i karbonilnog stresa (Anraku, Chuang et al. 2013, Turell, Radi et al. 2013), koji su izraženi u mnogim bolestima, tokom formiranja imunskog odgovora, ali pre svega u metaboličkim poremećajima poput dijabetesa. U dijabetesu je povećan stepen glikacije proteina. Tiolna grupa Cys34 je meta za reakciju glikacije/karbonilacije jer je pri fiziološkim uslovima mnogo jači nukleofil od amino- i guanidino-grupa lizina i arginina. Reaktivna

dikarbonilna jedinjenja (glikoksal, metilglioksal, deoksiglukazon), koja se u značajnoj količini generišu u dijabetesu, Alzheimer-ovoj bolesti, anemiji, uremiji, aterosklerozi i bolestima jetre, bubrega i srca, odnosno u karbonilnom stresu, reaguju sa ostacima lizina, arginina i tiolnom grupom Cys34 dovodeći do stvaranja različitih proizvoda glikacije (AGEs-Advanced glycation end products). Posledica ovih reakcija je promena tercijarne strukture proteina, odnosno njihove aktivnosti i funkcije, tako da se mnoge od dalekosežnih posledica dijabetesa mogu povezati sa procesima oksidacije i glikacije proteina (Thornalley, Langborg et al. 1999, Anguizola, Matsuda et al. 2013).

U dijabetesu su u cirkulaciji povišeni i nivoi slobodnih MK. Epidemiološke studije su pokazale da je povišen nivo slobodnih MK u cirkulaciji nezavistan faktor rizika za kardiovaskularne bolesti, uključujući i slučajeve iznenadnih smrti kod ljudi srednjeg doba koji nisu imali istoriju kardiovaskularnih bolesti (Jouven, Charles et al. 2001). Povišen nivo MK u cirkulaciji povezan je i sa rezistencijom na insulin (faktor rizika za razvoj dijabetesa tipa 2) (Roden, Stingl et al. 2000, Staehr, Hother-Nielsen et al. 2003), masnom jetrom (de Almeida, Cortez-Pinto et al. 2002, Paschos and Paletas 2009), arterosklerozom (Smith and Wilson 2006) i disfunkcijom miokarda (Oliver and Opie 1994, Jouven, Charles et al. 2001, Oliver 2001). Iako ne postoje dokazi da Cys34 ostatak učestvuje u vezivanju MK za HSA, pokazano je da vezivanje MK može da dovede do promene reaktivnosti Cys34-SH grupe (Torres, Turell et al. 2012), što ukazuje na mogućnost promene sposobnosti HSA, kao depona tiola u plazmi, da učestvuje u zaštiti od oksidativnog i karbonilnog stresa.

Patološki uslovi za koje su karakteristični hiperlipidemija i karbonilni stres mogli bi, kroz promenu reaktivnosti tiolne grupe (kao posledice vezivanja masnih kiselina), uticati na njen potencijal kao hvatača reaktivnih karbonilnih vrsta, a time i na vrednosti sadržaja tiolne grupe koje se primenjuju kao markeri oksidativnog/karbonilnog stresa. Stoga je cilj ove teze ispitivanje uticaja vezivanja različitih masnih kiselina (zasićenih, mono- i polinezasićenih) na stepen karbonilacije Cys34 tiolne grupe metilglioksalom u *in vitro* uslovima.

Budući da su u karbonilnom stresu molekuli HSA modifikovani, radi procene efekata različitih masnih kiselina na potencijal tiolne grupe kao hvatača reaktivnih vrsta ispitan je uticaj vezivanja masnih kiselina na reaktivnost Cys34-SH grupe (kinetiku reakcije

tiolne grupe sa Elmanovim reagensom) nemodifikovanog HSA, ali i HSA koji je prethodno karbonilovan metilglioksalom u *in vitro* uslovima. U cilju boljeg razumevanja navedenog uticaja praćene su promene elektroforetskih svojstava i konformacije HSA molekula u toku karbonilacije.

Riblje ulje je uobičajeni suplement u ishrani (posebno kod bolesti kardiovaskularnog i nervnog sistema), sadrži nezasićene omega-3 masne kiseline DHA i EPA. Cilj doktorske disertacije je, takođe, da se ispita uticaj vezivanja masnih kiselina ribljeg ulja na reaktivnost tiolne grupe albumina, odnosno sagledavanje mogućnosti modulacije svojstava HSA kao hvatača reaktivnih dikarbonila pomoću suplemenata.

Uticaj vezanih MK na svojstva Cys34 tiolne grupe kao „hvatača“ se dodatno usložnjava u patološkim stanjima u kojima se odvijaju reakcije glikacije (u kojima se dodatno menja konformacija HSA molekula), u stanjima za čiji tretman se koriste brojni lekovi. Sadržaji masnih kiselina, reaktivnih karbonilanih i kiseoničnih vrsta su povećani u dijabetesu, povećana je i glikacija/karbonilacija proteina, tako da promene reaktivnosti tiolne grupe u ovim uslovima mogu uticati na dugoročne efekte hiperglikemije u ovom patološkom stanju. Zato je cilj teze određivanje sadržaja Cys34-SH grupe, i njegova korelacija sa sadržajem HbA1c i stepenom karbonilacije HSA (određenog sa 2,4-dinitrofenil-hidrazinom) kod osoba obolelih od dijabetesa tipa 2 i u kontrolnoj grupi. Posebna pažnja će biti usmerena na određivanje reaktivnosti tiolne grupe HSA (odnosno određivanje konstante brzine reakcije tiolne grupe HSA), izolovanog iz seruma dijabetičara i kontrolne grupe, sa Elmanovim reagensom.

Da bi se sa sigurnošću mogao proceniti uticaj MK, vezanih za HSA kod obolelih od dijabetesa, na reaktivnost tiolne grupe neophodno je odrediti njihov sadržaj u uzorcima HSA izolovanim iz seruma. U tu svrhu cilj je, takođe, da se razvije kvantitativna TLC metoda koja bi trebalo da obezbedi tačno, reproduktivno, ali i brzo i jednostavno određivanje sadržaja MK, koje je pogodno za kliničku praksu.

2. Pregled literature

2.1. Biosinteza, razgradnja i uloga humanog serum-albumina

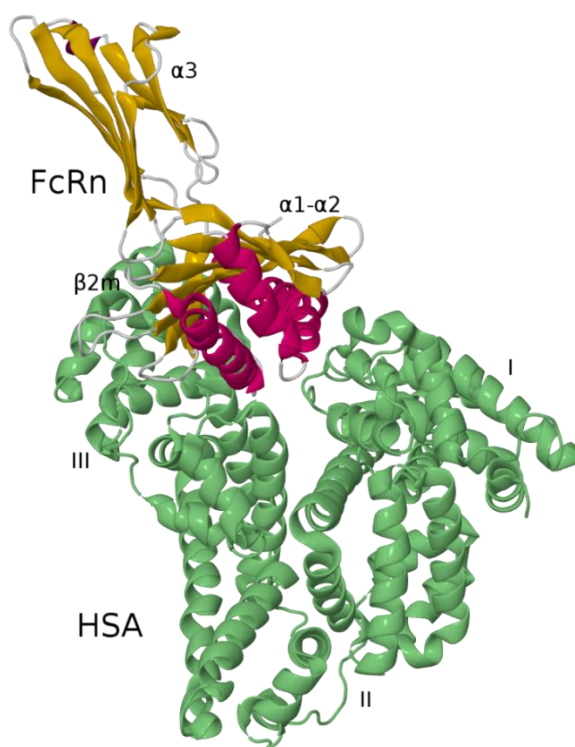
Sinteza HSA odvija se u jetri, gde nastaje kao prost, monomerni protein bez prostetičnih grupa, kovalentno vezanih lipida ili šećera. Evolutivno HSA pripada velikoj albuminskoj superporodici proteina koja obuhvata α -fetoprotein, vitamin D-vezujući protein (Gc-globulin) i afamin (α -albumin) (Carter and Ho 1994, Kragh-Hansen 2013). Albuminska superfamilija obuhvata i α -fetoprotein-povezani gen, koji je usled više mutacija neaktivni pseudogen kod ljudi. Svi geni su u obliku jedne kopije, a četiri aktivna gena u humanom genomu su eksprimirana kodominantno, tj. oba alela se eksprimiraju. Geni se nalaze na 4. hromozomu, na poziciji 4q11-13. Albuminski gen je sačinjen od 16961 nukleotida, podeljen je na 15 egzona simetrično raspoređenih u tri domena za koje se pretpostavlja da su nastali triplikacijom jednog osnovnog domena. Prepisana mRNA za HSA nosi informaciju za sintezu prekursorskog proteina (pre-pro-albumina) od 609 aminokiselina. Pre-peptid od 18 aminokiselinskih ostataka sa N-terminusa vodi nascentni albuminski peptidni lanac od ribozoma, na kome se sintetiše, kroz receptor na membrani endoplazmatskog retikuluma u lumen retikuluma, a potom biva brzo uklonjen. Protein potom biva transportovan u vanćelijski prostor do perisinusoidalnog prostora i hepatičkog sinusoida, a tokom transporta (u Goldžijevom aparatu) biva uklonjeno još 6 aminokiselina sa N-terminusa, tako da se sekretorni HSA molekul sastoji od 585 aminokiselina, sa prosečnom molekulskom masom od oko 66,7 kDa.

Kod zdravih osoba oko 13,8 g HSA se dnevno sintetiše u jetri i sekretuje u krvotok, što odgovara oko 25 % ukupne sinteze proteina u jetri. Ipak, samo 20 – 30 % hepatocita je uključeno u sintezu albumina, te je teoretski moguća sinteza 200 – 300 % u odnosu na prosečnu sintezu HSA (Evans 2002). Ukupan sadržaj HSA u organizmu je oko 360 g, od koga je oko dve trećine van cirkulacije. U odnosu na ostala tkiva, u cirkulaciji je najveća koncentracija HSA, gde sa oko 80 % doprinosi koloidnom osmotskom pritisku plazme (Peters 1996). Poluživot HSA u plazmi je oko 19 dana, a ovaj relativno dugi poluživot za protein plazme je povezan sa distribucijom HSA između cirkulacije i ekstravaskularnog prostora putem limfatičkog sistema (Peters 1996). U ekstravaskularni

prostor HSA ulazi na više načina: putem fenestriranih kapilara, sinusoidalnih kapilara (uglavnom u jetri i slezini, ali i u koštanoj srži, limfnim čvorovima, adrenalnim žlezdama), putem transcelularnog transporta posredovanog receptorom. Transport posredovan receptorom odvija se u endotelijumu (osim u mozgu) i alveolarnom epitelijumu pomoću receptora gp60 (60-kDa glikoprotein – albondina) (Merlot, Kalinowski et al. 2014, Sleep 2015) i posredstvom intracelularnog receptora FcRn (neonatalni Fc receptor) (Bern, Sand et al. 2015). Receptor FcRn eksprimira se u ćelijama mnogih tkiva i značajno doprinosi dugom poluživotu HSA u cirkulaciji, jer štiti HSA (i IgG) od razgradnje u lizozomima (Bern, Sand et al. 2015). Strukturalno FcRn je glikoprotein sačinjen od teškog lanca, nalik teškom lancu MHC klase I, sa tri ekstracelularna domena ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$) koji su nekovalentno povezani sa $\beta 2$ -mikroglobulinskim ($\beta 2m$) lakim lancem (Zhu, Peng et al. 2002, Roopenian and Akilesh 2007, Larsen, Kuhlmann et al. 2016). Naime, nakon što ćelija preuzme HSA pinocitozom, FcRn koji je eksprimiran na membrani ali ne interaguje sa HSA pri fiziološkim pH, sada u kiselim uslovima koji vladaju u endozomima FcRn snažno vezuje HSA, a endozomi sa HSA-FcRn kompleksom (Slika 1) fuzionišu sa bazolateralnom stranom membrane dovodeći do egzocitoze HSA i vraćanja u cirkulaciju, budući da se pH opet vraća na fiziološku vrednost (Bern, Sand et al. 2015). Ukoliko je HSA hemijski modifikovan, npr. oksidacijom ili glikacijom, ili je konformaciono promenjen, ne dolazi do vezivanja za FcRn receptor, te je nemoguće recikliranje takvog molekula i on biva razgrađen u lizozomima. Razgradnja HSA se odvija u više organa. Važno je napomenuti da je transcitoza dva do tri puta intenzivnija kada je HSA zasićen masnim kiselinama u odnosu na odmašćeni HSA (Galis, Ghitescu et al. 1988). Ova činjenica je jako bitna, jer pokazuje kako je fiziološki favorizovan proces da HSA koji nosi ligande lakše prolazi u ekstravaskularne prostore. Receptori Gp18 i Gp30, koji su najviše ekspimirani na ćelijskim membranama endotelijuma posebno u jetri (Ottend, Via et al. 1992) i peritonealnim makrofagima (Schnitzer and Oh 1992, Zhang, Yang et al. 1993), nasuprot receptoru Gp60 koji reciklira HSA, vezuju modifikovane oblike HSA, npr. HSA obeležen česticama zlata ili HSA tretiran formaldehidom (Ghinea, Eskenasy et al. 1989, Schnitzer, Sung et al. 1992, Schnitzer and Bravo 1993, Schnitzer and Oh 1994, Merlot, Kalinowski et al. 2014) i te

modifikovane forme vode do lizozoma na razgradnju (Schnitzer 1993, Schnitzer and Bravo 1993, Merlot, Kalinowski et al. 2014).

U cirkulaciji HSA vezuje i transportuje mnoge endogene supstance: neesterifikovane masne kiseline, bilirubin, žučne kiseline, steroidne hormone, hematin, triptofan, tiroksin, neke vitamine i jone metala (Carter and Ho 1994, Colmenarejo 2003, Clerici, Colombo et al. 2014). Takođe je predložena i puferska uloga molekula HSA u cirkulaciji (Colmenarejo 2003).

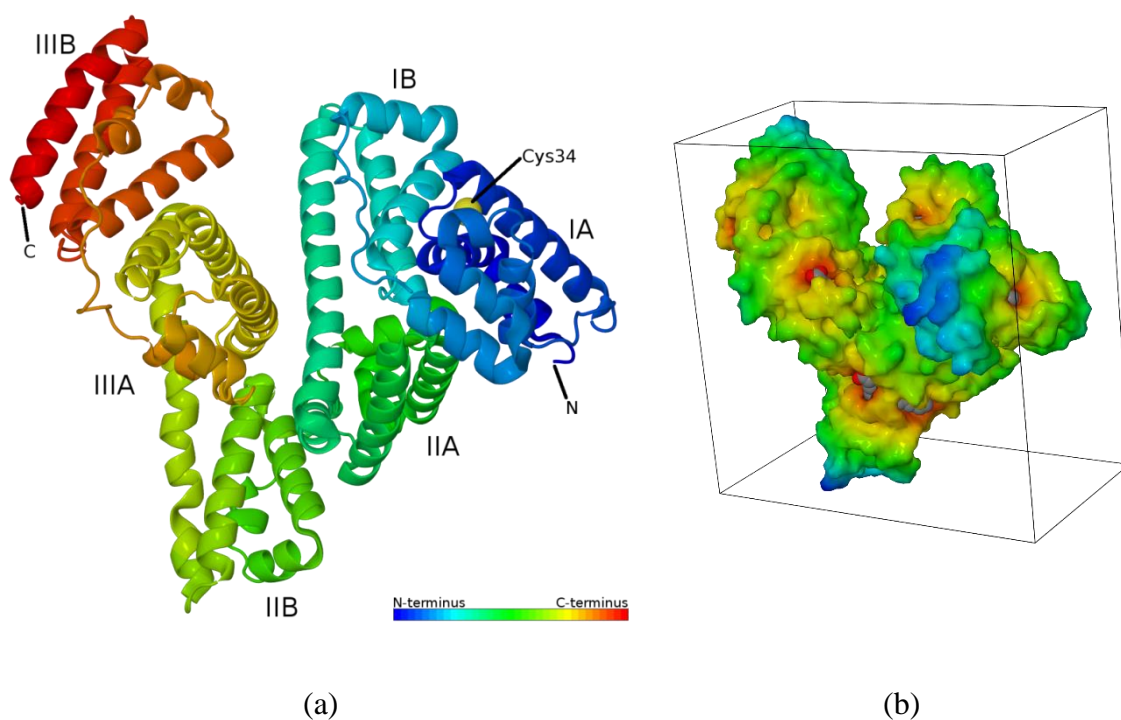


Slika 1 - Kompleks FcRn receptora i HSA u endozomu (PDB ID 4N0F). Prikaz je načinjen u programu Jmol v14.14.1.

2.2. Struktura humanog serum-albumina

Trodimenzionalna struktura HSA ispitana je u kristalografskim studijama do rezolucije od 2,3 Å (Curry, Mandelkow et al. 1998, Sugio, Kashima et al. 1999, Hein, Kragh-

Hansen et al. 2010). Polipeptidni lanac formira protein u obliku srca dimenzija oko $80 \times 80 \text{ \AA}$ i debljine oko 30 \AA (Slika 2). Oko 67 % strukture je u obliku α -heliksa, bez β -pločica, a u strukturi su jasno uočljiva tri homologa domena (I, II i III), pri čemu svaki domen ima subdomene A i B (Slika 2). Subdomen A ima 6, a subdomen B 4 α -heliksa, koji su između domena povezani fleksibilnim petljama. Studije u rastvorima pokazale su dobro slaganje između kristalografske strukture HSA i strukture u rastvoru (Olivieri and Craievich 1995, Ferrer, Duchowicz et al. 2001). U molekulu HSA prisutno je 35 ostataka cisteina i svi su, osim ostatka Cys34, u okviru disulfidnih mostova.



Slika 2 - (a) Model strukture molekula HSA. Uočavaju se tri domena I, II i III sa subdomenima A i B, i položaj ostatka Cys34. (b) Površina molekula HSA sa prikazom jedinične ćelije oko molekula (širine i visine od po oko 80 \AA i debljine oko 30 \AA). Prikazi su načinjeni u programu Jmol v14.14.1.

2.3. Vezivna mesta i ligandi koji se vezuju za humani serum-albumin

2.3.1. Vezivanje liganada na N-terminusu HSA

Oblast N-terminusa vezuje više metalnih jona (Cu^{2+} , Ni^{2+}) u kvadratno-planarnim kompleksima između jona i aminokiselinskih ostataka Asp1, Ala2, His3. Metalni joni

su helirani sa α -amino-azotom Asp1 ostatka, prva dva peptidna azota i N1 imidazolskim azotom ostatka His3. Jon Co^{2+} vezuje se manjim afinitetom za isto mesto, ali je u heliranje ovog jona uključena β - COO^- grupa Asp1 i ϵ -amino grupa Lys4 (Fanali, di Masi et al. 2012, Bal, Sokolowska et al. 2013). Interesantno je napomenuti da je vezivanje Co^{2+} jona za HSA iskorišćeno kao klinički parametar u detektovanju srčane ishemije (Bar-Or, Rael et al. 2008, Lu, Stewart et al. 2012, Lee, Eom et al. 2014). Ipak, verovatnije je da interakcija Co^{2+} -HSA u tim uslovima ne uključuje N-terminus, već mesta na HSA koja podležu promenama u ishemiji (Bal, Sokolowska et al. 2013).

2.3.2. Vezivna mesta na subdomenima I i II

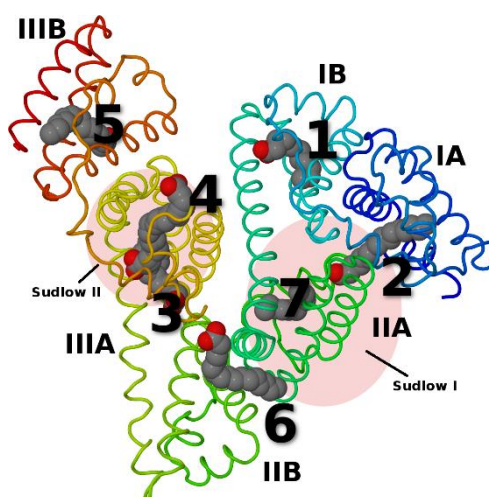
Visokoafinitetno mesto za vezivanje MK srednjeg i dugog lanca nalazi se u oblasti između subdomena IA i IIA, što je NMR studijama sa C^{13} obeleženom MK potvrđeno na primeru palmitata (Simard, Zunszain et al. 2006). Metilenski rep MK anjona upada u uzani hidrofobni džep formiran od aminokiselina dva subdomena, dok je polarna karboksilna glava MK stabilizovana preko sonih mostova sa Tyr150, Arg257 i Ser287.

U subdomenu IA nalazi se Cys34 ostatak sa jedinom slobodnom tiolnom grupom na molekulu HSA. Iako je Cys34-SH dosta zaklonjena na površini HSA, grupa je veoma reaktivna i pored pomenute funkcije u antioksidativnom tiolnom kapacitetu u plazmi, Cys34-SH vezuje i jone Hg^{2+} , Ag^+ , Au^+ , Pt^{2+} (Fanali, di Masi et al. 2012), a u reakciji sa NO i 8-nitro-cGMP formira S-nitrozotiol i S-cGMP-HSA (Ishima, Chen et al. 2012, Ishima, Hoshino et al. 2012).

Subdomen IB poseduje veliku šupljinu, nalik slovu L, sa naelektrisanim ostacima poput Arg117 i Arg186 koji formiraju vodonične veze na ulazu u šupljinu (Zunszain, Ghuman et al. 2008). Visokoafinitetno vezivno mesto za bilirubin i fuzidinsku kiselinu nalazi se u pomenutoj šupljini, pri čemu vezivanje ovih liganada ne dovodi do značajnih konformacionih promena šupljine. Sa druge strane, visokoafinitetno vezivanje hemina i niskoafinitetno vezivanje anjona MK dovodi do značajne konformacione promene šupljine.

Subdomen IIA ima izuzetno značajnu ulogu u vezivanju mnogih lekova za HSA, što je prvi potvrdio Sadlov (Sudlow) u eksperimentima sa fluorescentnim probama (Sudlow,

Birkett et al. 1975). Dva veoma afinitetna mesta po Sadlovu nazvana su Sudlow I i Sudlow II (Slika 3), od kojih se Sudlow I mesto nalazi u subdomenu IIA. Sudlow I mesto je izuzetno adaptivno i vezuje strukturno veoma različite ligande. Mesto je veliko i potvrđeno je više primera vezivanja dva nezavisna liganda (Kragh-Hansen, Chuang et al. 2002). Takođe je potvrđena velika fleksibilnost vezivnog mesta, te je mesto podeljeno od strane nekih autora (Yamasaki, Maruyama et al. 1996, Kragh-Hansen, Chuang et al. 2002) na više manjih mesta sa različitim afinitetima vezivanja (Ia, Ib i Ic) gde je npr. za varfarin odgovorno mesto Ia, a za azapropazon Ib. Kristalografske studije pokazale su da je unutrašnjost vezivnog mesta uglavnom nepolarna (Ghuman, Zunszain et al. 2005), sa jezgrom u kome se nalazi jedini triptofanski ostatak proteina Trp214, ali sa dve polarne oblasti: prvom u okviru dna vezivnog mesta (Tyr150, His242 i Arg257) i drugom na spoljnoj ivici vezivnog mesta (Lys195, Lys199, Arg218 i Arg222).



Slika 3 - Model molekula HSA sa vezanim MK i obeleženim varfarinskim (Sudlow I) i indol-benzodiazepinskim mestima (Sudlow II) vezivanja

2.3.3. Subdomen III u vezivanju liganada

Sudlow II mesto (indol-benzodiazepinsko mesto) nalazi se u subdomenu IIIA (Slika 3). Ligandi koji se vezuju za ovo mesto uglavnom su alifatične ili aromatične karboksilne kiseline, sa negativno naelektrisanom karboksilnom grupom orijentisanom ka ivicama vezivnog mesta i ostatkom molekula ka hidrofobnom centru mesta. Sudlow II mesto je manje, selektivnije za ligande i manje fleksibilno od Sudlow I mesta (Kragh-Hansen,

Chuang et al. 2002). Ligandi koji se vezuju za Sudlow II mesto su L-triptofan, diazepam, nekoliko NSAID lekova, a oktanoat i MK dužeg niza imaju mesto vezivanja visokog afiniteta u Sudlow II oblasti (Simard, Zunszain et al. 2006). Kristalografske studije su pokazale da se mesta Sudlow I i II značajno menjaju u odmašćenom HSA (Ghuman, Zunszain et al. 2005). Sudlow II mesto ima samo jednu glavnu oblast sa polarnim aminokiselinskim ostacima oko hidrofobnog džepa, sačinjenu od ostataka Arg410, Tyr411, Lys414 i Ser489.

Subdomen IIIB poseduje vezivno mesto za palmitat i druge MK srednjeg i dugog lanca (Bhattacharya, Grune et al. 2000, Simard, Zunszain et al. 2006). Karboksilna grupa MK interaguje sa ostatkom Lys525 i često sa ostatkom Tyr401. Pretpostavlja se da u ovoj oblasti postoji vezivno mesto visokog afiniteta za L-tiroksin i na osnovu ispitivanja sa mutantima HSA zaključeno je da je ostatak Lys525 bitan i za vezivanje ovog liganda (Kragh-Hansen, Minchiotti et al. 2016).

2.3.4. Centralni interdomenski procep

Opisano je svega nekoliko liganada koji se vezuju u oblasti velikog procepa između domena I i III. Dva mesta niskog afiniteta za dekanat, ali ne i za MK dužeg alifatičnog niza, postoje u ovoj oblasti (Bhattacharya, Grune et al. 2000).

2.4. Masne kiseline u cirkulaciji

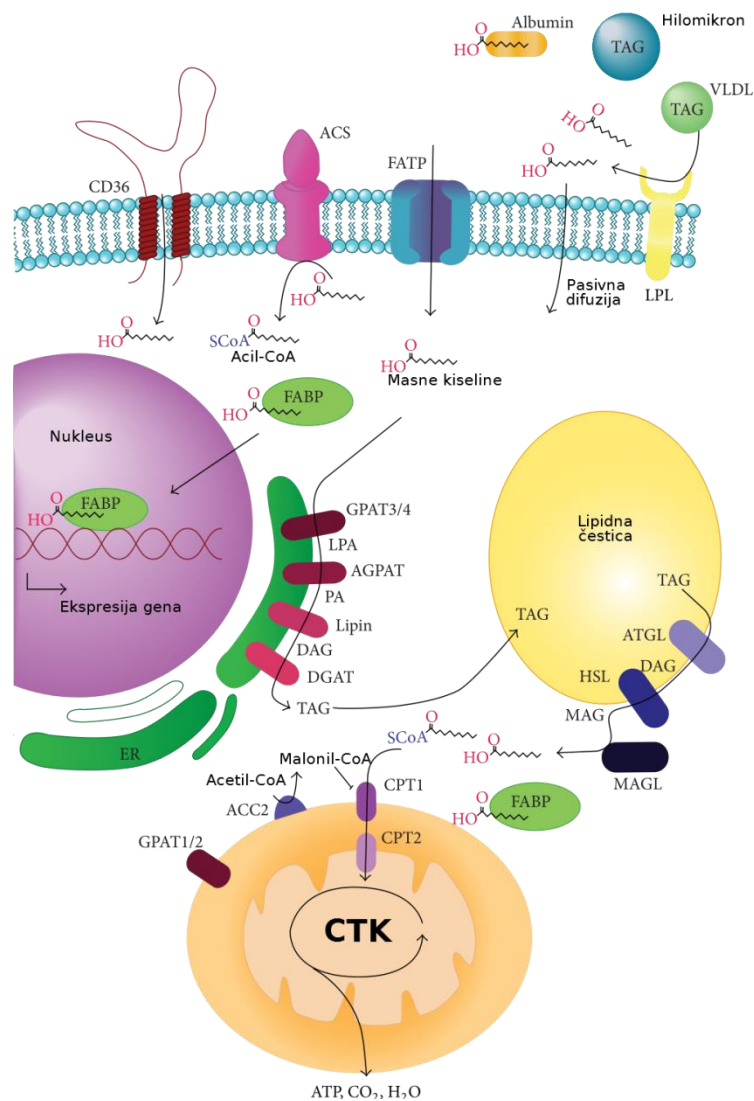
Masne kiseline su primarni izvor energije u mnogim tkivima: skeletnim mišićima tokom odmora, renalnom korteksu, jetri i miokardu (Coppack, Jensen et al. 1994). Bazalna koncentracija MK u plazmi je aproksimativno 250 – 500 $\mu\text{mol/L}$ (Rogiers 1981), od čega je većina poreklom iz potkožnih masnih rezervi, a veoma malo iz intra-abdomenskih masnih tkiva (Nielsen, Guo et al. 2004).

Masne kiseline dugog lanca (uglavnom C16 i C18), pored činjenice da su značajan izvor metaboličke energije, neophodne su u sintezi membranskih lipida, hormona i sekundarnih glasnika. Dominantne su u plazmi i njihovo poreklo je primarno iz triglicerida, uskladištenih u adipoznim tkivima. Kada postoji povećana potreba za

energijom u specifičnim tkivima u organizmu, javlja se povećana lipoliza u adipoznom tkivu (Lafontan and Langin 2009). Kod ljudi se svakodnevno oko 200 g MK mobilize iz adipoznog tkiva (Cistola and Small 1991), što za posledicu ima povećanje nivoa MK u cirkulaciji. Međutim, prisustvo MK kao slobodnih u serumu je zanemarljivo usled njihove male rastvorljivosti (manje od 1 $\mu\text{mol/L}$) pri fiziološkom pH i jonskoj sili seruma. Stoga se oslobođene MK vezuju za HSA i tako se transportuju kroz cirkulaciju i tkiva. Transport MK je praćen brzom izmenom (eng. turnover) u cirkulaciji sa poluživotom od 2 do 4 minuta (Eaton, Berman et al. 1969, Barnett, Blindauer et al. 2013). Iako nije jasno dokazan put MK od HSA kroz ćelijsku membranu do citoplazme, najverovatniji mehanizmi su pored proste difuzije, postojanje specifičnih receptora (Balaban, Lee et al. 2015).

Masne kiseline srednjeg i dugog lanca lako se apsorbuju i ulaze u cirkulaciju nakon unosa hranom (Jorgensen, Fitch et al. 2001, Barnett, Blindauer et al. 2013). U cirkulaciji se nalaze ili kao slobodne MK vezane za HSA ili se transportuju kao triacilgliceroli (TAG) u okviru hilomikrona i lipoproteinskih čestica veoma niske gustine (VLDL). Kao TAG u cirkulaciji bivaju hidrolizovani dejstvom lipoprotein lipaze (LPL) do slobodnih MK i potom unete u ćeliju (Wong and Schotz 2002, Balaban, Lee et al. 2015).

Slika 4 prikazuje dalju sudbinu slobodnih MK u metabolički aktivnim ćelijama.



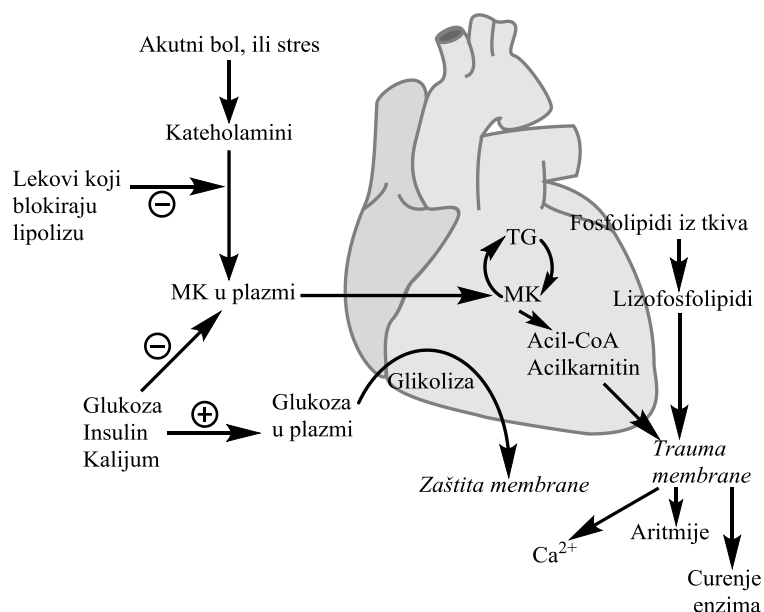
Slika 4 - Metabolizam MK u ćeliji. Pojednostavljeni prikaz metaboličkih puteva: MK iz cirkulacije donešene putem TAG (hilomikrona i VLDL-a) i potom hidrolizovane do slobodnih MK dejstvom LPL-a, ili donešene kao slobodne MK vezane za HSA, prolaze kroz plazma membranu. Unete MK bivaju prevedene u MK acil-CoA i kao takve ulaze ili u put sinteze TAG (za skladištenje u adipoznom tkivu), ili u put razgradnje β -oksidacijom u mitohondrijama, što omogućava sintezu ATP-a. (ACS: acil-CoA sintaza; AGPAT: acil-CoA:acilglicerol-3-fosfat aciltransferaza; ATGL: adipozna triglicerid-lipaza; DAG: diacilglicerol; DGAT: diacilglicerol-aciltransferaza; GPAT: glicerol-3-fosfat-aciltransferaza; HSL: hormon senzitivna lipaza; LPA: lizofosfatidna kiselina; MAG: monoacilglicerol; MAGL: monoacilglicerol-lipaza; PA: fosfatidna kiselina, FATP: proteinski transporteri MK (eng. Fatty acids transport proteins). Adaptirano prema Balaban et al. (Balaban, Lee et al. 2015)

2.4.1. Patofiziološka stanja u kojima je povišen nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji

Kao što je napred navedeno, bazalna koncentracija MK u plazmi je u opsegu od 250 do 500 $\mu\text{mol/L}$ (Rogiers 1981). Hronično povišena koncentracija MK u plazmi povezana je sa mnogim poremećajima: kancerom, dijabetesom, gojaznošću i metaboličkim sindromom, a takođe je i simptom smanjene koncentracije HSA u plazmi, tzv. analbuminemija (Steinfeld, Waldmann et al. 1961). Koncentracija MK kod gojaznih osoba je najverovatnije povišena zbog značajnog udela adipoznog tkiva u ukupnoj masi organizma, i sa time u vezi poremećen je i proces uklanjanja MK iz cirkulacije (Boden 1998), tj. vreme izmene. Takođe, povišena koncentracija MK u cirkulaciji inhibira efekat insulina na lipolizu što dodatno povećava koncentraciju MK u plazmi (Jensen, Haymond et al. 1989). Trudnoća je navedena kao specifično stanje sa povišenom koncentracijom MK u plazmi (Boden 1996, Sivan, Homko et al. 1998). U ranoj trudnoći adipozno tkivo majke se uvećava, međutim u odmakloj trudnoći hormoni lipolize su znatno aktivniji što uzrokuje intenzivnu razgradnju deponovanih masti i time dovodi do povećanja koncentracije MK u cirkulaciji. Pojava dovodi do insulinske rezistencije i preokreta od oksidacije ugljenih hidrata na oksidaciju masti kao glavnog izvora energije čime se postiže maksimizacija dostupne glukoze za potrebe fetusa u fazi intenzivnog razvoja (Boden 1996). Dokazano je da nivo MK u plazmi zavisi i od pola i uzrasta, tako da kod dečaka nivo MK opada do puberteta, dok se kod devojčica ne menja sa starenjem (Heald, Arnold et al. 1967).

Odavno je primećeno da se koncentracija slobodnih MK u cirkulaciji povećava tokom kardijačne ishemije i progresivno raste neposredno pre i posle infarkta srca (Tansey and Opie 1983). Ta činjenica je iskorišćena u predviđanju stepena oštećenja srčanog mišića tokom ishemije. Razmatrano sa fiziološkog aspekta, srčani mišić zavisi isključivo od aerobnog metabolizma, te za razliku od skeletnih mišića, ne može ući u stanja sa značajno smanjenom koncentracijom dostupnog kiseonika. Srce kao osnovni izvor energije u oksidativnom metabolizmu koristi MK tokom odmora, glukozu nakon obroka, a laktat i MK tokom fizičkog napora (Oliver and Opie 1994). Kada deo srčanog mišića nema dovoljno dostupnog kiseonika, kao u ishemiji, balans supstrata biva poremećen i neoksidovani proizvodi MK metabolizma se lokalno nagomilavaju. Tokom

ozbiljnih ishemija i ranih faza kardijačne infarkcije postoje i dodatni spoljni faktori: povećanje kateholamina u cirkulaciji koje vodi ka povećanju koncentracije MK u cirkulaciji njihovim oslobađanjem iz adipoznog tkiva; smanjeno oslobađanje insulina iz pankreasa koji je neophodan za unos glukoze u srčanom mišiću (Oliver and Opie 1994). Povećana koncentracija MK u plazmi uzročnik je daljih srčanih aritmija nakon kardijačne infarkcije. Danas je uglavnom prihvaćena teorija da su slobodne MK „loš“ prognostički faktor u srčanoj ishemiji, a glukoza „dobar“ prognostički faktor. Povezanost slobodnih MK, glukoze, kalijuma, insulina i kateholamina na promene u srčanom mišiću tokom ishemije prikazana je shematski na Slici 5. Mehanizam toksičnosti slobodnih MK u uslovima srčane ishemije je kompleksan, ali u osnovi je povezan sa adrenargičnom stimulacijom. Koncentracija noradrenalina (oslobođenog iz postganglijskih simpatičkih nerava) raste već u prvim minutima ishemije srca i ostaje povišena oko 20 h, zavisno od odgovora na stres, a vezivanjem za adrenargične receptore ćelija miokarda i koronarnih arteriola doprinosi održanju srčanog ritma u uslovima ishemije. Međutim, višak noradrenalina u cirkulaciji, pored nesumnjivog doprinosa održanju srčanog ritma, dovodi do brojnih negativnih sistemskih metaboličkih odgovora, npr. stimuliše lipolizu u adipoznom tkivu što dovodi do povećanja slobodnih MK u cirkulaciji, do povećanja nivoa kortizola u plazmi (Kurien and Oliver 1966, Mueller and Ayres 1978, Oliver 2001), do povećanja glikogenolize u jetri uz istovremeno smanjenje lučenja insulina, koji je neophodan za preuzimanje glukoze u srčanom mišiću (Oliver 2001). U izolovanom srcu pacova slobodne MK su direktni aritmogeni, čak i u odsustvu ishemije, a primećeno je da je okidač aritmija upravo odnos slobodnih MK i albumina (Makiguchi, Kawaguchi et al. 1991). Tokom ishemije β -oksidacija MK u mitohondrijama je inhibirana i u ćelijama dolazi do akumulacije acilkarnitina i acil-CoA. Acilkarnitin inhibira Ca^{2+} -pumpu sarkoplazminog retikuluma, kao i Na^+-Ca^{2+} port sarkoleme i Na^+-K^+ pumpu, a može aktivirati i Ca^{2+} jonske kanale (Huang, Xian et al. 1992), što dovodi do prevelike koncentracije Ca^{2+} jona u citosolu i dovodi do aritmija. Slobodne MK dovode do povećanja cAMP-a u tkivima, što kao posledicu opet dovodi do Ca^{2+} -zavisnih aritmija (Oliver and Opie 1994, Oliver 2001).

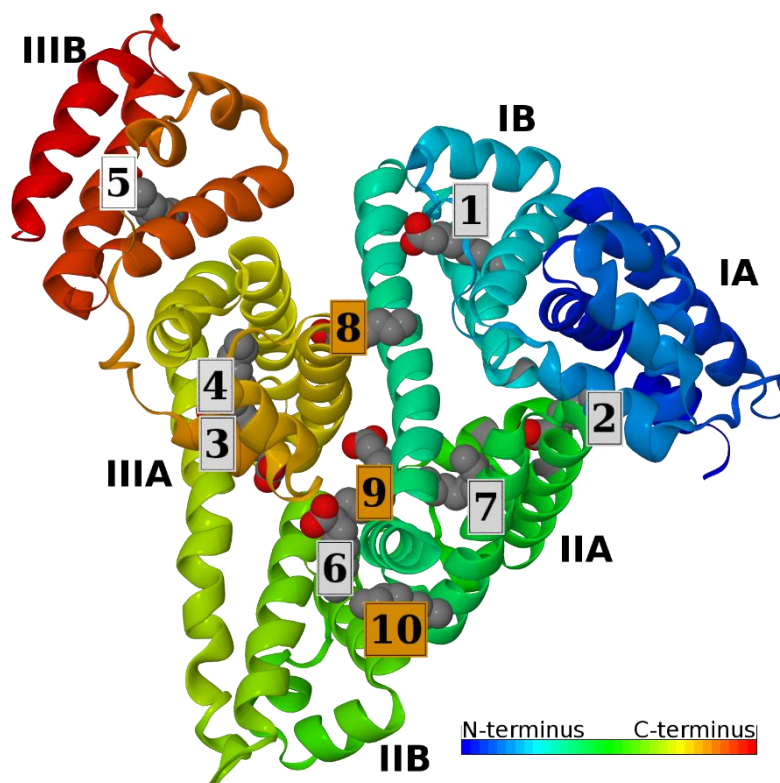


Slika 5 - Uticaji različitih faktora na srčani mišić tokom ishemije. Objašnjenje je dato u tekstu.

2.5. Mesta vezivanja masnih kiselina na molekulu humanog serumalbumina

Pri normalnim fiziološkim uslovima 0,1 – 2,0 mola MK je vezano po molu HSA (Brodersen, Andersen et al. 1990, Simard, Zunszain et al. 2006). Taj broj se znatno menja i može imati značajno više vrednosti u uslovima promenjene ishrane, tokom fizičkog napora, ali i u brojnim patološkim stanjima dijabetesu, bolestima jetre ili kardiovaskularnim bolestima (Bahr, Hostmark et al. 1991, Bergman and Ader 2000, Oliver 2001, Lu, Stewart et al. 2012). Već je napomenuto da je publikovano više kristalografskih studija kompleksa MK-HSA sa kiselinama srednjeg i dugog lanca (kaprionskom C10:0, laurinskom C12:0, miristinskom C14:0, palmitinskom C16:0, stearinskom C18:0 kiselinom), do rezolucije od oko 2,5 Å (Bhattacharya, Grune et al. 2000). Poređenjem ovih struktura utvrđeno je da molekul HSA poseduje sedam dobro definisanih mesta za vezivanje MK srednjeg i dugog lanca (Slika 6), koja su podeljena prema nomenklaturi predloženoj od strane Curry i saradnika (Curry, Mandelkow et al. 1998). Mesta vezivanja za pomenute MK se preklapaju. Kasnije studije, pre svega kompetitivne studije i NMR ispitivanja (sa ¹³C obeleženom MK) u rastvoru, pokazale su

da se mesta vezivanja MK često preklapaju sa mestima vezivanja drugih liganada (Simard, Zunszain et al. 2006), te da utiču na afinitet vezivanja, a direktno i na trodimenzionalnu strukturu molekula HSA.

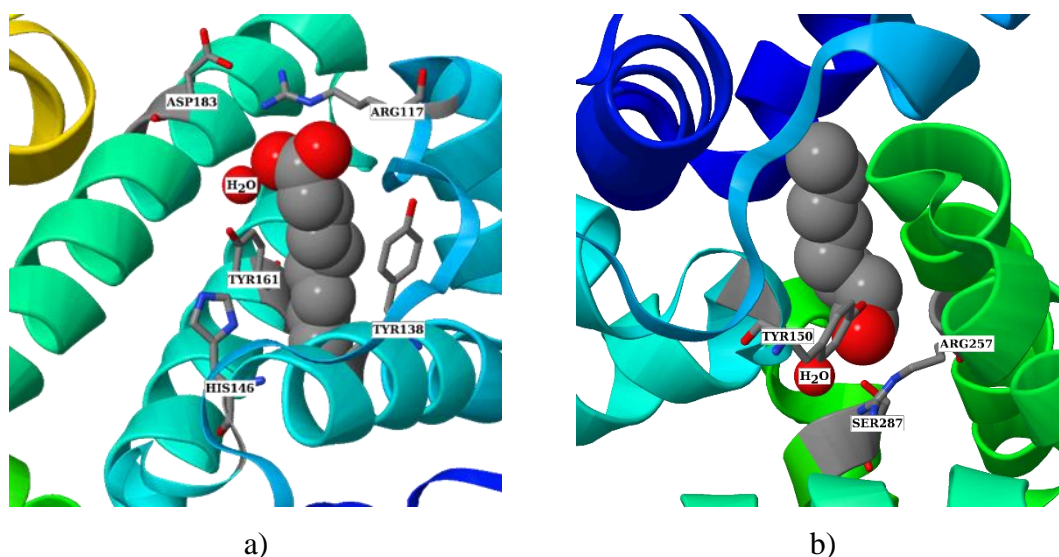


Slika 6 – Mesta vezivanja masnih kiselina za HSA. Model molekula HSA sa vezanom kaprinskom kiselinom. Uočava se sedam dobro definisanih mesta koja su univerzalna za MK srednjeg i dugog lanca (mesta 1 – 7), ali i dodatna mesta koja su otvorena samo za neke MK srednjeg lanca (mesta 8 – 10). Prikazi su načinjeni programom Jmol v14.14.1 na osnovu kristalografskih podataka za PDB ID 1E7E – HSA zasićen kaprinskom (C10:0) kiselinom.

Mesto 1. Nalazi se u subdomenu IB u okviru procepa oblika slova D između četiri heliksa subdomena. U poređenju sa drugim mestima, mesto 1 je relativno otvoreno prema rastvoru. Mesto je u odsustvu MK zatvoreno steking interakcijom Tyr138 sa Tyr161 ostatkom. Nakon ulaska molekula MK u procep oba tirozinska ostatka rotiraju za gotovo 90° tako da drže hidrofobni rep MK u vezivnom džepu (Slika 7a) (Curry,

Brick et al. 1999). Zanimljivo je da je elektronska gustina veoma jasna za MK srednjeg lanca (C10:0 – C14:0), međutim postaje nejasna kod MK dužeg niza (C18:0), gde takođe Tyr138 ostatak ima drugačiju poziciju, što upućuje da je mesto 1 plitko ili pak dolazi do tzv. „cut-off“ efekta kako raste hidrofobnost, odn. dužina alifatičnog repa MK (Bhattacharya, Grune et al. 2000).

Sve ispitane MK vezuju se za mesto 1 u istoj orijentaciji, sa karboksilnom grupom (glavom) povezanom vodoničnom vezom sa ostatkom Arg117, molekulom vode koji je most između glave i ostatka Tyr161 i karbonilnim kiseonikom iz ostatka Leu182. Duže MK (C16:0, C18:0) izlaze van ove oblasti i dosežu do ostatka His146.



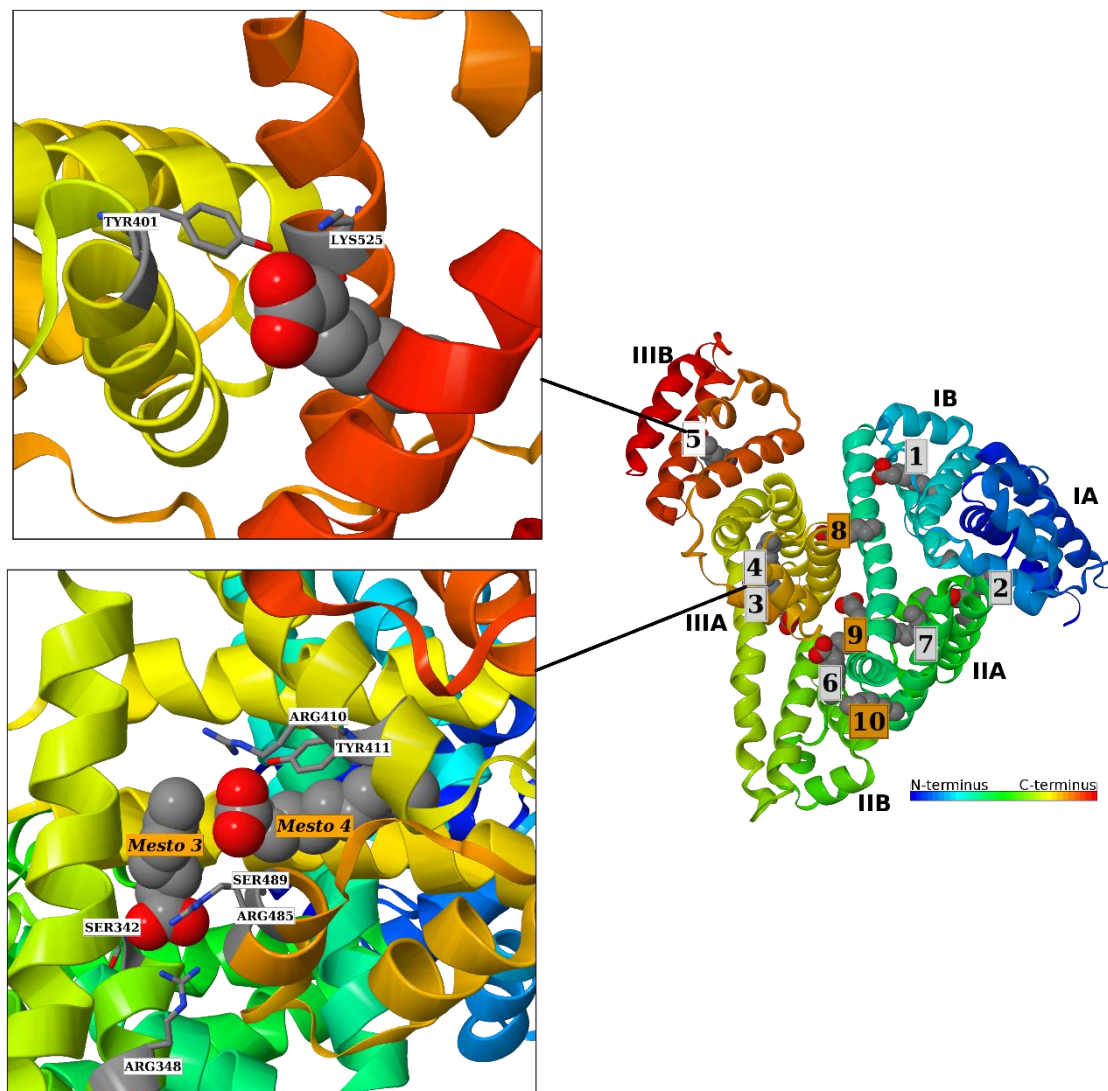
Slika 7 – Prikaz mesta 1 (a) i mesta 2 (b) vezivanja masnih kiselina sa ostacima aminokiselina koji stabilizuju MK u vezivnom mestu. Detaljno objašnjenje je dato u tekstu. Prikazi su načinjeni programom Jmol v14.14.1 na osnovu kristalografskih podataka za PDB ID 1E7E – HSA zasićen kapronskom (C10:0) kiselinom.

Mesto 2. Nalazi se između subdomena IA i IIA i u poređenju sa ostalim mestima to je najviše zatvoreno vezivno mesto u kome je čak i karboksilna grupa MK zaklonjena od rastvarača (Slika 7b). Usled takve zatvorenosti vezivnog mesta, vezivaje MK prati seriju konformacionih promena u tom regionu HSA, što je uočeno posmatranjem odmašćenog HSA gde je mesto 2 podeljeno na dva polumesta (Curry, Mandelkow et al. 1998, Curry, Brick et al. 1999). Formiranju vezivnog mesta prethodi rotacija domena I u odnosu na

domen II, koja je stabilizovana vezivanjem liganda. U svim ispitanim kristalografskim modelima karboksilna grupa MK (glava) je stabilizovana vodoničnim vezama u subdomenu IIA sa bočnim ostacima Tyr150, Arg257 i Ser287. Metilenski rep se pruža linearno unutar ravne hidrofobne šupljine formirane nakon rearanžmana IA i IIA subdomena. Dobra elektronska gustina svih ispitanih MK (C10:0 – C18:0) u mestu 2 potvrđuje visoku stabilizaciju MK u vezivnom mestu. Važno je napomenuti da je u nekim kristalografskim modelima primećena delimična struktura metilenskog repa MK, što upućuje da se na mesto 2 nastavlja novo vezivno mesto (naznačeno kao 2') koje MK može samo delimično da popuni, a da veći deo molekula MK izlazi iz mesta i zbog toga daje neuređenu sliku u kristalografskim modelima (Bhattacharya, Grune et al. 2000).

Mesta 3 i 4. Nalaze se u subdomenu IIIA (Slika 8) i veoma su bliska. MK su u ovim mestima orijentisane gotovo pod pravim uglom jedna u odnosu na drugu, a njihovi metilenski repovi ostvaruju kontakt (Curry, Mandelkew et al. 1998, Bhattacharya, Grune et al. 2000). Sve ispitane MK prate na isti način zauzimaju mesta 3 i 4. U okviru mesta 3, karboksilna glava MK je učvršćena u istoj poziciji vodoničnim vezama sa ostacima Ser342 i Arg348 iz subdomena IIB i Arg485 iz subdomena IIIA. Primećeno je da što je duži metilenski rep MK to je molekul sve više prinuđen da se uvija u „U-konfiguraciju“, odn. da se prilagođava obliku vezivnog mesta, jer je mesto sposobno da u linearnoj konfiguraciji primi rep dužine 12 – 14 metilenskih grupa (Bhattacharya, Grune et al. 2000).

Mesto 4, za razliku od mesta 3, poseduje dužu i ravniju hidrofobnu šupljinu (tunel), tako da se sve MK uklapaju na isti način u okviru hidrofobnog tunela, nezavisno od broja metilenskih grupa. Karboksilne glave MK se uklapaju na isti način zauzimajući gotovo identične pozicije za različite MK, jer su pozicionirane vodoničnim vezama ostataka Arg410, Tyr411 i Ser48 iz subdomena IIIA. Kako raste dužina MK karboksilna grupa ostaje u istoj poziciji, a rep MK se pruža duž hidrofobnog tunela kroz subdomen IIIA. Kod jako dugih MK (C18:0 i dužih) molekul je dovoljno dugačak da se prostire između dva polarna kraja mesta 4, te karboksilna glava C18:0 može biti stabilizovana i ostatkom Ser419 i Thr422, što dugim MK daje mogućnost da mesto 4 zauzmu u dve suprotne orijentacije (Bhattacharya, Grune et al. 2000).

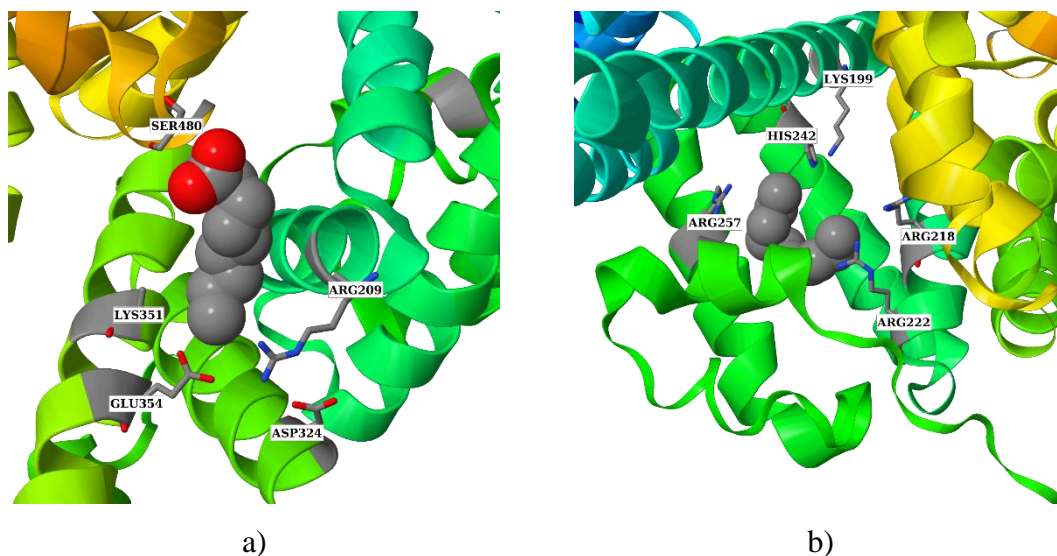


Slika 8 – Prikaz mesta 3 i 4, i mesta 5 vezivanja masnih kiselina sa ostacima aminokiselina koji stabilizuju MK u vezivnom mestu. Detaljno objašnjene je dato u tekstu. Prikazi su načinjeni programom Jmol v14.14.1 na osnovu kristalografskih podataka za PDB ID 1E7E – HSA zasićen kapronskom (C10:0) kiselinom.

Mesto 5. Mesto je formirano u hidrofobnom kanalu koji se proteže dužinom subdomena IIIB i u svim ispitanim slučajevima pronađeno je da se MK vezuje u izduženoj linearnoj konfiguraciji duž mesta. Karboksilna glava MK stabilizovana je vodoničnim vezama sa

ostacima Lys525 i često sa Tyr401, dok se metilenski rep prostire duž hidrofobnog tunela (Slika 8). Usled velike fleksibilnosti Lys525, karboksilna glava nije dobro pozicionirana kao u mestima 2 i 4. Slično kao kod mesta 4, duge MK (C18:0 i duže) su dovoljno dugačke da ispune kanal u potpunosti, tako da njihov rep izlazi iz kanala i u kontaktu je sa rastvaračem. Ipak za razliku od mesta 4, u mestu 5 nije potvrđeno da duge MK mogu da zauzimaju mesto u dve suprotne orijentacije (Bhattacharya, Grune et al. 2000).

Mesto 6. Mesto je izuzetno plitko (Slika 9a) na samoj površini molekula HSA između subdomena IIA i IIB (Curry, Mandelkow et al. 1998, Curry, Brick et al. 1999). Za razliku od opisanih mesta 1 – 5 ne postoje jasno pozicionirani aminokiselinski ostaci koji učvršćuju MK vodoničnim vezama. Elektronske gustine oko karboksilne glave veće su na strani prema subdomenu IIB, pa se pretpostavlja da aminokiseline sa te strane više interaguju sa MK. Bočni ostaci koji verovatno interaguju sa MK su Arg209, Lys351 i Ser480 formirajući vodonične veze, a ostatak Arg209 i sone mostove oko molekula MK sa ostacima Asp324 i Glu354. Ispitivanja BSA idu u prilog tome da je ostatak Lys351 uključen u stvaranje vodonične veze sa molekulom MK, jer je dokazano da kod BSA Lys349 (koji strukturno odgovara Lys351 iz HSA) interaguje sa C16:0 koja je aktivirana Vudvarovim reagensom K (Reed 1986). Usled opisanih nespecificnosti mesta 6 prema MK (izostanak stabilizacije i orijentisanja MK u vezivnom mestu) zaključuje se da je afinitet mesta 6 prema MK dosta niži od mesta 1 – 5. Ovakav zaključak je potvrđen u studiji u kojoj je HSA zasićen sa C14:0, inkubiran sa anestetikom halotanom, pri čemu je kristalografska analiza pokazala da je u mestu 6 MK bila zamenjena halotanom, za razliku od mesta 1 – 5 u kojima je ostala MK (Bhattacharya, Curry et al. 2000).



Slika 9 – Prikaz mesta 6 (a) i mesta 7 (b) vezivanja masnih kiselina sa ostacima aminokiselina koji stabilizuju MK u vezivnom mestu. Detaljno objašnjene je dato u tekstu. Prikazi su načinjeni programom Jmol v14.14.1 na osnovu kristalografskih podataka za PDB ID 1E7E – HSA zasićen kapronskom (C10:0) kiselinom.

Mesto 7. Nalazi se u hidrofobnoj šupljini subdomena IIA (Slika 9b). Mesto je analogno hidrofobnoj šupljini iz subdomena IIIA, odn. mesta 3 i 4, međutim mesto 7 je značajno manje. Prve studije nisu prepoznavale mesto 7 usled činjenice da je mala elektronska gustina oko karboksilne glave MK i nemogućnosti da se glava prikaže u modelu (što je i nedostatak prikaza na Slici 9b za mesto 7) (Curry, Mandelkow et al. 1998). Ipak, ponavljanje šablona za ostale MK dovelo je do zaključka da je u pitanju dobro definisano mesto za vezivanje MK (Bhattacharya, Grune et al. 2000), a u PDB datotekama prisutan je samo zapis za metilenski rep MK. Pomenuti nedostatak u pogledu pozicije karboksilne glave dovodi u pitanje koji aminokiselinski ostaci su uključeni u stabilizaciji MK, ali se pretpostavlja da su usled odgovarajuće blizine uključeni ostaci Lys199, Arg218, Arg222, His242 i Arg257 (koji formira soni most sa karboksilnom grupom MK iz mesta 2) (Bhattacharya, Grune et al. 2000). Mesto 7 je niskog afiniteta prema MK, što upućuje i činjenica da je u prisustvu 0,5 mmol/L trijodobenove kiseline C14:0 lako zamenjena u mestu 7 ovim molekulom (Curry,

Mandelkowitz et al. 1998). Ipak, mesto 7 je možda primarno vezivno mesto za MK kratkog lanca (Bhattacharya, Grune et al. 2000).

2.5.1. Dodatna vezivna mesta za MK srednjeg i dugog lanca

Kristalografske studije za MK srednjeg lanca (konkretno C10:0, prikazane na Slici 6) pokazale su da pored sedam specifičnih mesta vezivanja MK, na molekulu HSA postoje i dodatna mesta, uglavnom locirana u predelu velikog procepa između domena I i III.

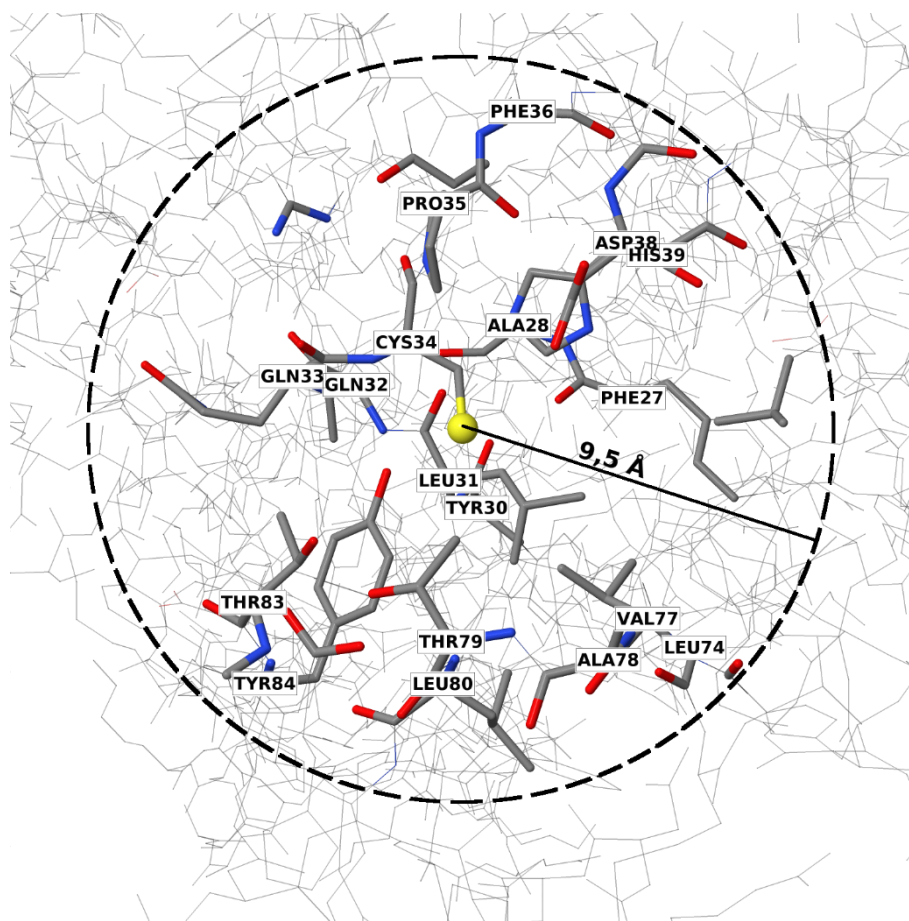
Mesto 8 (Slika 6) nalazi se blizu osnove interdomenskog procepa. Metilenski rep C10:0 molekula vezanog u mestu 6 pomaže u formiranju hidrofobnog kraja džepa u mestu 8, što se može smatrati kooperativnom interakcijom. Na drugoj strani šupljine nalazi se prsten od ostataka polarnih aminokiselina Lys195, Lys199, Arg218, Asp451 i Ser454. Karboksilna grupa MK u mestu 8 ostvaruje permanentnu vodoničnu vezu samo sa ostatkom Ser454. Dublje u interdomenskom procepu nalazi se mesto 9, koje više predstavlja otvorenu površinu u kojoj se može naći C10:0 molekul, nego jasno oformljeno vezivno mesto. Bočni ostaci Lys190 i Glu187 iz domena I i Lys432 iz domena III ostvaruju kontakte sa MK. Pretpostavlja se da su pomenuta mesta prisutna u slučaju vezivanja C10:0, ali ne i MK dužeg niza, zbog toga što fleksibilnost trodimenzionalne strukture i konformacione promene HSA tokom vezivanja MK za mesta 1 – 7 dovode do sužavanja interdomenskog procepa između domena I i III u slučaju C10:0 za oko 1 – 2 Å, što utiče na opstanak vezivnih mesta 8 i nadalje.

2.6. Reaktivnost Cys34 tiolne grupe

Većina molekula HSA (70 – 80 %) u cirkulaciji poseduje redukovanu Cys34 tiol grupu. U manjem obimu, od oko 2 – 5 %, u cirkulaciji se nalaze oksidovane forme Cys34 tiolne grupe, kao što su sulfinska (Cys34-SO₂H) i sulfonska (Cys34-SO₃H) kiselina (Slika 10) (Turell, Botti et al. 2009, Alvarez, Carballal et al. 2010, Torres, Turell et al. 2012). Približno 20 - 30 % Cys34-SH je blokirano disulfidnom vezom sa malim molekulima cisteinom, homocisteinom i glutationom (Stewart, Blindauer et al. 2005).

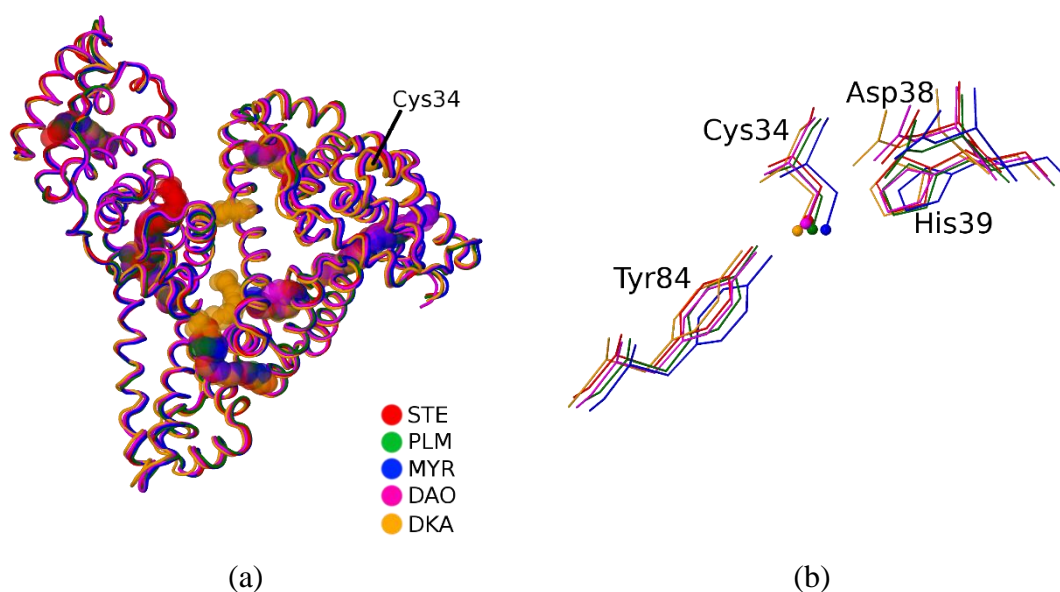
antioksidativnog kapaciteta, budući da bi u slučaju neregulisanog procesa taj tiolni kapacitet brzo bio potrošen, brže od sinteze novog HSA.

Reaktivnost Cys34-SH kontrolisana je okruženjem tiolne grupe i delimičnom zaklonjenošću grupe na površini molekula HSA. Kristalografske studije pokazuju da je Cys34-SH na dnu plitkog džepa dubokog oko 9,5 Å (Slika 11). Tiolna grupa je neposredno okružena polarnim i jonizabilnim grupama ostataka Asp38, imidazolskim prstenom His39 i hidroksilnom grupom Tyr84 (Stewart, Blindauer et al. 2005). Upravo ovakvi uslovi dovode do neobičnih osobina Cys34-SH u odnosu na tiolnu grupu prostih tiola. Ispitivanje mutanata His39Leu i Tyr84Phe pokazala su drastične promene u reaktivnosti Cys34-SH (Stewart, Blindauer et al. 2005).



Slika 11 - Okruženje Cys34-SH grupe. Ostaci polarnih aminokiselina Asp38, His39 i Tyr84 stabilizuju Cys34-SH grupu koja se na površini molekula HSA nalazi na dnu plitkog džepa prečnika 9,5 Å. Prikaz je načinjen programom Jmol v14.14.1 na osnovu PDB ID 1E7I.

Promene u tercijalnoj strukturi HSA nakon vezivanja liganada dovode i do promena reaktivnosti Cys34-SH grupe (Torres, Turell et al. 2012). Najznačajnije promene su nakon vezivanja molekula MK, jer su MK najzastupljenije na molekulu HSA i značajno utiču na strukturu HSA. Upoređivanjem kristalografskih podataka više kompleksa HSA sa MK, uočava se velika doslednost i vezivnih mesta za MK i apsolutnih pozicija Cys34-SH u odnosu na polarne ostatke Asp38, His39 i Tyr84 (Slika 12).



Slika 12 - Preklopljene strukture nekoliko kristalografskih modela HSA sa MK. (a) kristalografske strukture na osnovu PDB podataka (PDB ID 1E7I, STE – stearinska kiselina; PDB ID 1E7H, PLM - palmitinska kiselina; PDB ID 1E7G, MYR – miristinska kiselina; PDB ID 1E7F, DAO – laurinska kiselina; PDB ID 1E7E, DKA – kapronska kiselina). (b) Cys34-SH u odnosu na Asp38, His39 i Tyr84 u različitim HSA-MK strukturama. Prikaz je načinjen programom Jmol v14.14.1.

Pokazano je da se vezivanjem masnih kiselina za HSA povećava se dostupnost ostatka Cys34 za reakciju, otvara se šupljina u kojoj je smešten ovaj ostatak. U kompleksu HSA sa stearinskom kiselinom dostupnost iznosi 4.9 %, u odnosu na 0.7 %, (koliko iznosi u odmašćenom HSA %) (Torres, 2012), a raste i rastojanja između S atoma Cys34 i kiseonika karboksilne grupe Asp38, azota imidazolskog prstena His39, i kiseonika hidroksilne grupe Tyr84 u odnosu na odmašćeni HSA. Ove konformacione promene

dovode i da se reaktivnost Cys34-SH značajno menja prilikom vezivanja MK. Tako prilikom vezivanja stearinske kiseline reaktivnost Cys34-SH se povećava 6 puta sa DTNB-om i oko 2 puta sa H₂O₂ (Torres, Turell et al. 2012). U istoj studiji utvrđeno je da, pod istim uslovima vezivanja stearinske kiseline, reaktivnost Cys34-SOH raste manje od reaktivnosti redukovanog oblika Cys34-SH.

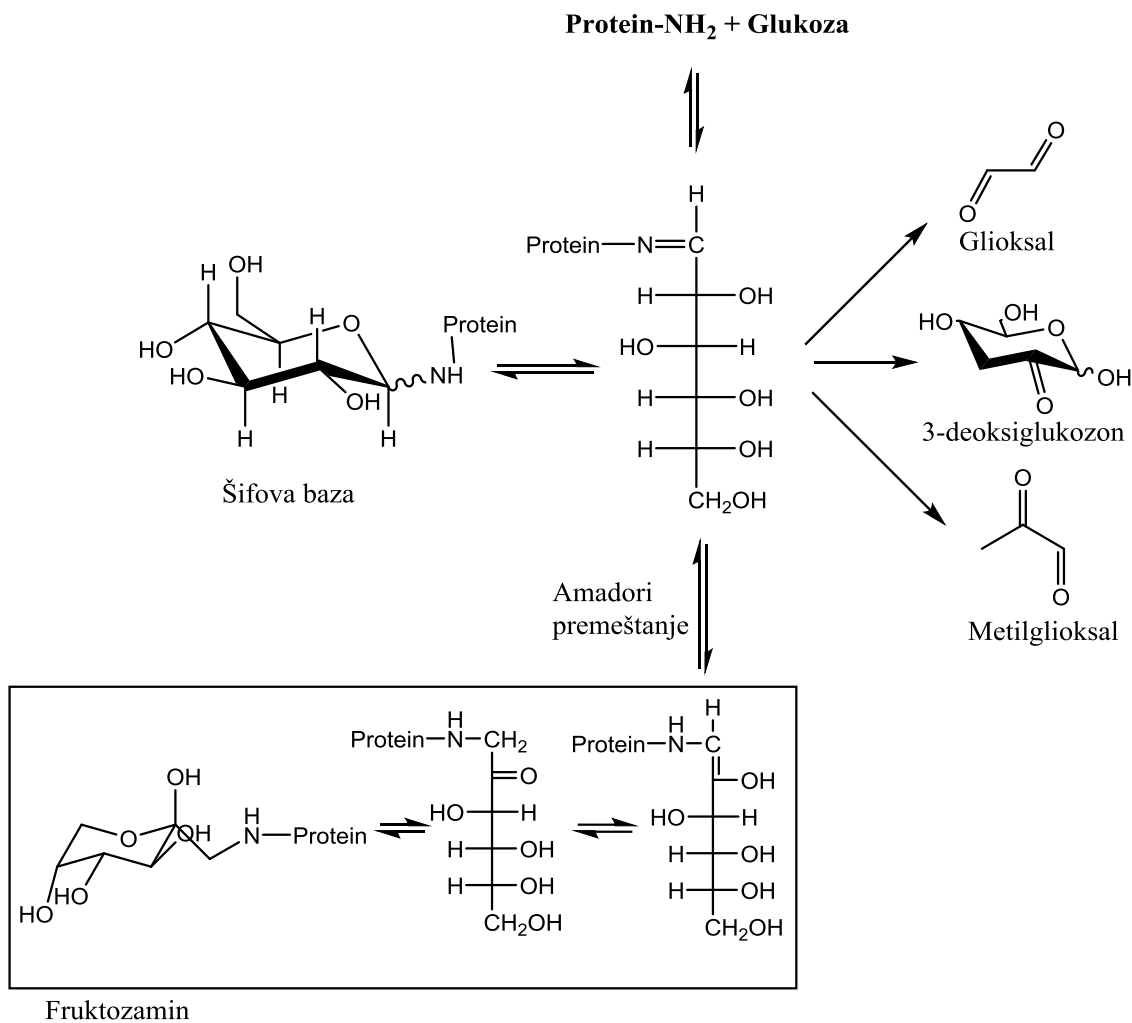
2.7. Glikacija/karbonilacija humanog serum-albumina.

Pored oksidacije i nitrozilacije, glikacija/karbonilacija albumina takođe dovodi do promene njegove strukture i posledično do promene u vezivanju liganada i antioksidativnoj aktivnosti. Ove promene mogu imati veliki značaj u modulaciji antioksidativne funkcije albumina, posebno u stanjima kada je koncentracija albumina smanjena (hemodijaliza, sepsa, ciroza).

Glikacija je spontana reakcija karbonila sa amino-, guanidino- i tiolnom grupom na površini molekula proteina, koja nije enzimski katalizovana (Thornalley, Langborg et al. 1999). Ispitivanja reakcije glukoze sa HSA pokazala su da neki od lizinskih ostataka na površini molekula HSA reaguju stvarajući Šifovu bazu u obliku cikličnog glukozilamina. Kada se uspostavi ravnoteža, koncentracija nagrađene Šifove baze je oko 0,3 % koncentracije glukoze (Baynes, Thorpe et al. 1984). Amadorijevim premeštanjem aciklični oblik Šifove baze (Slika 13) reverzibilno prelazi u N_ε-(1-deoksi-D-fruktoza-1-il) aminokiselinski ostatak (Thornalley, Langborg et al. 1999), odnosno nastajefruktozamin ili „Amadorijev proizvod“. Ovo su rani procesi glikacije, i Šifove baze i fruktozamini se stoga nazivaju ranim proizvodima glikacije. U krvnoj plazmi hemijska ravnoteža između Šifove baze i fruktozamina sporije se dostiže nego između glukoze i Šifove baze, za oko 38 h pri eksperimentalnim uslovima (Smith and Thornalley 1992). Koncentracija fruktozamina kod zdravih osoba je oko 140 μmol/L, a povećava se 2 – 3 puta u dijabetesu (Kato, Nakayama et al. 1989, Thornalley, Langborg et al. 1999).

Fruktozamin se razlaže povratnim Amadori premeštanjem do Šifove baze, a potom daljim oksidativnim i neoksidativnim reakcijama dolazi do stvaranja mnogih stabilnih konačnih proizvoda glikacije ((*Advanced Glycation Endproducts*, AGE). Postoje eksperimentalni dokazi da AGE proizvodi dovode do brojnih komplikacija u dijabetesu

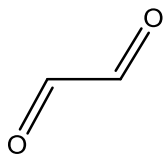
i drugim metaboličkim poremećajima (Thornalley 1996, Thornalley, Langborg et al. 1999). Neke od AGE proizvoda prepoznaju receptori ćelija endotela, monocita i makrofaga (Westwood, Argirov et al. 1997).



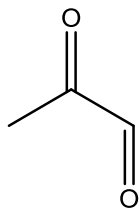
Slika 13 - Shema nastajanja fruktozamina i α -oksoaldehida, posle reakcije glikacije

2.7.1. α -oksoaldehidi i karbonilacija proteina

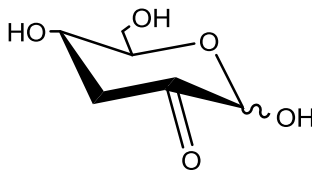
Najvažniji uzročnici karbonilnog stresa (stanja u kojem je povišen nivo reaktivnih karbonilnih vrsta, eng. reactive carbonyl species, RCS) u organizmu su dikarbonilni molekuli, α -oksoaldehidi poput glioksala, metilglioksala, 3-deoksiglukazona i glikolaldehida:



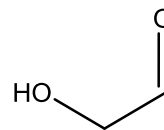
Glioksal



Metilglioksal

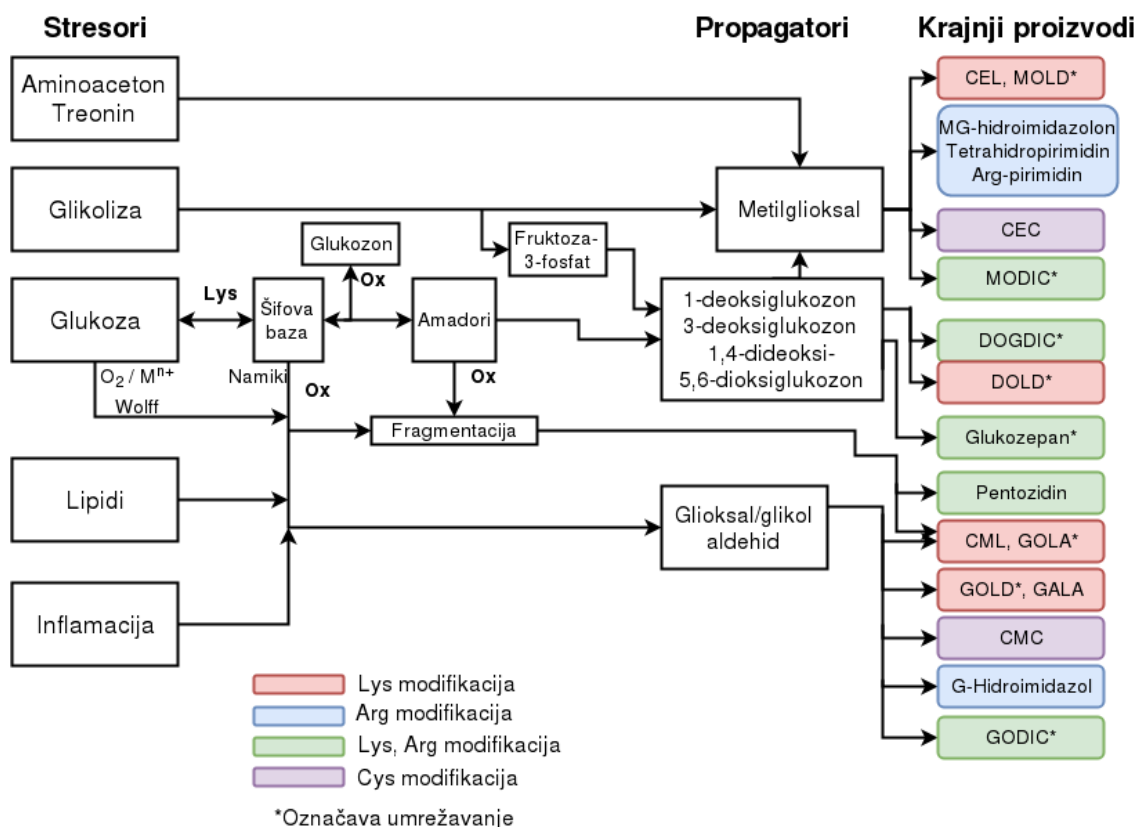


3-deoksiglukazon



Glikoaldehid

Autooksidacija glukoze, oksidacija i fragmentacija Šifove baze i Amadori proizvoda dovode do stvaranja pomenutih α -oksoaldehida (Slika 13). Analogne oksidacione i dehidratacione reakcije dešavaju se i sa drugim pentozama i heksozama, kao u procesu glikacije glukozom. Derivati glikacije metilglioksalom su gotovo uvek prisutni kada pri visokim koncentracijama glukoze dolazi do glikacije glukozom, što u cirkulaciji mogu biti i samo kraći periodi hiperglikemije (Thornalley, Langborg et al. 1999). Važno je napomenuti da glikacija monosaharidima nije jedini izvor α -oksoaldehida, već da oni nastaju i u drugim procesima *in vivo*: glioksal nastaje u lipidnoj peroksidaciji, metilglioksal nastaje fragmentacijom triozofosfata, potom u katabolizmu ketonskih tela i treonina, a 3-deoksiglukazon nastaje od fruktoza-3-fosfata (Slika 14). Nastala dikarbonilna jedinjenja su mnogo reaktivnija od gukoze, do oko 20000 puta (Maessen, Stehouwer et al. 2015)), dovode do mnogih paralelnih puteva glikacije i do stvaranja AGE proizvoda (Slika 14).



Slika 14 - Izvori reaktivnih karbonilnih jedinjenja (stresori), reaktivna karbonilna jedinjenja (propagatori karbonilnog stresa, kao što su metilglioksal, glioksal, 3-deoksiglukozon) i krajnji proizvodi glikacije bočnih aminokiselinskih ostataka proteina, CEL-karboksietil-lizin, MOLD-metilglioksal-lizin-dimer, MG-metilglioksal, CEC-karboksietil-cistein, MODIC-metilglioksal-imidazolonski kroslinking, DOGDIC-deoksiglukozon-imidazolonsko umreženje, DOLD-deoksiglukozon-lizin-dimer, CML-karboksietil-lizin, GOLA-glioksal-lizin-amid, GOLD-glioksal-lizin-dimer, GALA-glikolaldehid-lizin-amid, CMC-karboksietil-cistein, G-glioksal, GODIC-glioksalimidazolonsko umreženje (Prerađeno prema (Wu and Monnier 2003, Zeng and Davies 2006)).

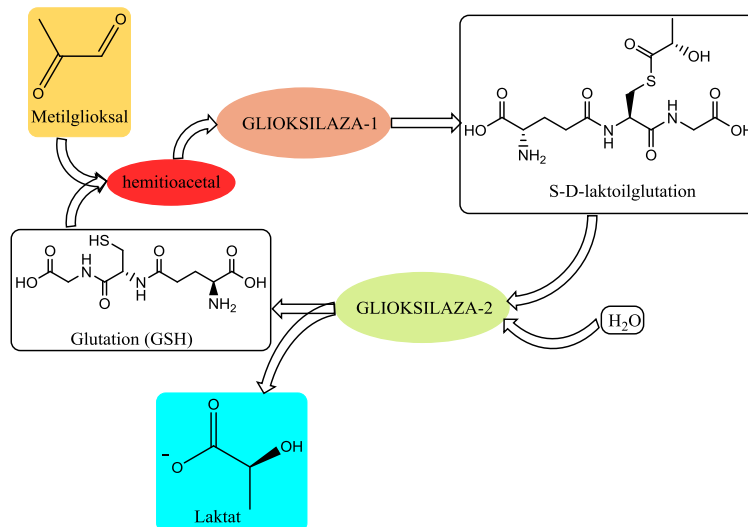
Dikarbonilna jedinjenja se generišu kao metaboliti u patofiziološkim stanjima, u dijabetesu, uremiji, Alzheimer-ovoj bolesti, arterosklerozi, bolestima jetre, bubrega i srca, u stanjima sa povišenim oksidativnim stresom, zapaljinskim procesima i uopšte pri starenju organizma (Lo, Westwood et al. 1994, Odani, Shinzato et al. 1999, Desai, Chang et al. 2010, Lu, Randell et al. 2011).

2.7.2. Metilglioksal, štetni efekti i uklanjanje

Metilglioksal je još 1913. godine prepoznat kao ključni intermedijer metabolizma glukoze kod životinja, biljaka i mikroorganizama (H. D. Dakin 1913). Dokazano je da je nivo metilglioksala značajno povišen kod osoba sa predispozicijama za razvoj dijabetesa, u dijabetesu i kod osoba koje konzumiraju hranu bogatu ugljenim hidratima (Brownlee 2001, Rodrigues, Matafome et al. 2017). Pretpostavlja se da mikrovaskularna disfunkcija dovodi do disfunkcije adipoznog tkiva kod gojaznih osoba (Rodrigues, Matafome et al. 2017) i hronične bubrežne bolesti indukovane ishemijom (Hirakawa and Inagi 2017). U osnovi poremećaja je i uticaj na insulinsku signalizaciju što dalje može dovesti do bolesne gojaznosti, metaboličkog sindroma i do razvoja dijabetesa tipa 2. Uvođenjem metilglioksala u ishranu eksperimentalnih pacova pokazalo je da do promena na nivou mikrovaskularizacije (praćene DCE-MRI tehnikom) dolazi veoma brzo, a uvođenje ishrane bogate lipidima dovodi do hipoksije adipoznog tkiva i razvoja rezistencije na insulin (Rodrigues, Matafome et al. 2017). Takođe je pokazano da u eksperimentalnim uslovima suplementacije metilglioksala i ishrane bogate lipidima dolazi do inhibicije glioksalaze-1, koja je ključni enzim glioksalaznog sistema, i time dolazi do daljeg nagomilavanja metilglioksala i drugih α -oksoaldehida čime se efekat glikacije proteina, smanjivanja koncentracije malih tiola i promena na vaskularnom sistemu dodatno intenzivira (Rodrigues, Matafome et al. 2017). Iako su promene hipoksije usled smanjene vaskularizacije i rezistencija na insulin izraženi u adipoznom tkivu, efekat postaje sistemski i odražava se na opšti metabolizam glukoze i razvoj dijabetesa tipa 2.

Metilglioksal, kao toksični proizvod metabolizma razgrađuje se u citoplazmi ćelije, u okviru glioksalaznog sistema koji katalizuje konverziju reaktivnih α -oksoaldehida do odgovarajućih α -hidroksikiselina (Sousa Silva, Gomes et al. 2013). Glioksalazni sistem je sačinjen od grupe enzima koji hidrolizuju spontano nastale proizvode reakcije oksoaldehida i malih tiola. Glioksalaza-1 katalizuje izomerizaciju hemitioacetala iz spontane reakcije α -oksoaldehida i glutationa (GSH) do S-2-hidroksiacilglutation-derivata i na taj način smanjuje koncentraciju α -oksoaldehida i prateće reakcije glikacije. Supstrati glioksalaze-1 su metilglioksal, glioksal i drugi aciklični α -oksoaldehidi. Humana glioksalaza-1 je dimerni cink-zavisni metaloenzim molekulske

mase 43 kDa (Cameron, Olin et al. 1997). Glioksalaza-2 katalizuje hidrolizu S-2-hidroksiacilglutation-derivata do α -hidroksikiselina i dovodi do regenerisanja glutationa (GSH) (Slika 15).



Slika 15 - Glioksalazni sistem. Metilglioksal i drugi aciklični α -oksoaldehidi spontano reaguju formirajući hemitioacetale koji su supstrati za glioksalazu-1. Nastali S-2-hidroksiacilglutation-derivat hidrolizuje dejstvom glioksilaze-2 do α -hidroksikiseline uz regenerisanje glutationa (GSH).

2.7.3. Patološka stanja u kojima je karbonilacija HSA povećana

Modifikacije HSA α -oksoaldehidima, posebno glioksalom i metilglioksalom, su značajno brže i obimnije nego modifikacije glukozom čak i pri nižim koncentracijama i kraćim inkubacionim periodima (Mera, Takeo et al. 2010, Acimovic, Jovanovic et al. 2013).

U mnogim patološkim stanjima detektovan je povišeni nivo karbonilovanih formi HSA. Albumin je glavni karbonilovani protein plazme u hroničnoj bubrežnoj bolesti kod pacijenata na hemodijalizi (Himmelfarb and McMonagle 2001), zatim u dijabetesu (Rasheed and Ali 2006), a karbonilovane forme HSA detektovane su i u urinu pacijenata na hemodijalizi kao i pacijenata sa dijabetesom koji imaju razvijenu bubrežnu insuficijenciju (Mera, Anraku et al. 2005).

2.8. Pregled metoda za određivanje sadržaja masnih kiselina

Kako je cilj ove teze sagledavanje efekta vezivanja MK za HSA na promenu reaktivnosti tiolne grupe Cys34, u *in vivo* i *in vitro* uslovima, neophodna je tačna procena sadržaja MK vezanih za HSA, posebno u uzorcima HSA izolovanim iz seruma. Do danas je publikovano više radova koji se bave kvantifikacijom slobodnih masnih kiselina u različitim biološkim uzorcima. U tabeli 1 sumirane su najviše citirane analitičke metode kvantifikacije MK.

Tabela 1. Pregled metoda za određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina

Analitičke metode	Reference
Gradenje kompleksa MK sa jonima prelaznih metala (Cu²⁺, Co²⁺, ...)	
Spektrfotometrijske metode	(Laurell and Tibbling 1967, Smith 1975, Tinnikov and Boonstra 1999, Chen and Vaidyanathan 2012)
Radiohemijske metode (upotreba ⁶⁰ Co izotopa)	(Ho and Meng 1969)
Titrimetrijske metode	
Makro-metode (kao metoda određivanja kiselinskog broja; druge titracije u nevodenoj sredini)	(Saad, Wai et al. 2007)
Mikro-metode	(Dole 1956)
Termometrijske titracije metode	(Smith 2003)
Enzimске i slične biohemijske metode	
Kuplovane enzimске reakcije acil-CoA sintetaze uz fluorimetrijsko praćenje koncentracije NADH	(Jebens and Sejersted 1992)
Metode bazirane na FABP (fatty acids binding protein) obeleženim fluorescentnom probom	(Richieri, Anel et al. 1993, Richieri and Kleinfeld 1995)
Spektroskopske i hromatografske metode	
FT-IR metode za direktno određivanje sadržaja nezasićenih, zasićenih i trans- MK.	(Yoshida 2008) (Wu, Chen et al. 2009)
Metode bazirane na GC razdvajanju MK-metil-estara i kvantifikaciju primenom internog standarda	(Dodds, McCoy et al. 2005)

3. Materijal i metode

3.1. Hemikalije i reagensi

U radu su korišćene isključivo p.a. hemikalije renomiranih svetskih proizvođača i distributera (Merck, Fisher-Scientist, Sigma Aldrich). 20 % rastvor HSA je nabavljen od Baxter-a, Beč, Austrija. Ovaj preparat, namenjen je za kliničku upotrebu, obično sadrži ~ 0,4 mmol –SH/mmol HSA;

3.2. Aparati

- Spektrofotometri Beckman DU-50, Shimadzu UV 1800,
- Spektrofluorimetar Fluoromax-4 Jobin Yvon,
- Gasni hromatograf Shimadzu GC 2014,
- Cetrifuge Tehnica LC 320, Eppendorf MiniSpin,
- pH metar Radiometar PHM 26,
- Centrikoni za ultrafiltraciju (Ultracel-30k i Amicon Ultra-15 Millipore),
- Vodeno kupatilo NeoMedica,
- Automatske mikropipete Brand,
- TLC silika gel komercijalne ploče TLC Silica gel 60 F₂₅₄,

3.3. Metode

3.3.1. Priprema komercijalnog humanog serum-albumina za *in vitro* istraživanja

Komercijalni HSA preparat koncentracije 200 mg/mL, upotrebljavan u *in vitro* ispitivanjima, sadrži više prezervativa i stabilizatora, koji pomažu očuvanju strukture molekula HSA tokom dugog skladištenja. Od ostalih sastojaka proizvođač je naveo:

natrijum-hlorid, kaprilna kiselina i N-acetiltriptofan. Budući da su u pitanju mali molekuli, za ispiranje komercijalnog preparata HSA upotrebljeni su centrikoni za filtraciju centrifugiranjem sa membranama 30000 i 10000 Da. Ispiranje je rađeno 0,1 mol/L natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4, uz više ponavljanja. Molekulska masa HSA je oko 67000 Da, tako da je nakon ispiranja samo HSA ostajao u rastvoru (fosfatnom puferu) iznad membrane centrikona. U rastvoru u je potom određena koncentracija HSA Biuretskim reagensom i bromkrezol zelenim (reagensom za albumin), a potom je dobijeni preparat razblažen fosfatnim puferom do željene koncentracije.

3.3.2. Izolovanje humanog serum-albumina iz seruma pacijenata

Uzorci krvi u kivetama za sakupljanje ostavljeni su da koagulišu na sobnoj temperaturi, pri čemu se jasno odvajaju krvna pogača i serum. Centrifugiranjem na 2500 rpm tokom 5 minuta i pažljivim radom, da ne dođe do lize eritrocita i oslobađanja hemoglobina, odvajan je serum, kao supernatant koji se lako pipetira.

Reagensi:

- Zasićeni rastvor amonijum-sulfata (pH 7,4),
- Fosfatni pufer 0,1 mol/L, pH 7,4.

Postupak: Izolovanje HSA iz seruma rađeno je taloženjem amonijum-sulfatom u dva koraka (Jovanović, 2013). U prvom koraku, u 1 mL uzorka seruma dodavan je zasićeni rastvor amonijum-sulfata (pH 7,4), uz konstantno mešanje na vorteksu do postizanja zasićenja od 54 % amonijum-sulfata. Precipitirani proteini, uglavnom globulini, uklanjani su se centrifugiranjem na 5000 rpm tokom 10 minuta i odvojen je supernatant sa HSA. Drugi korak se sprovodi na identičan način, osim što se zasićeni rastvor amonijum-sulfata dodaje do 70 % zasićenja. Pri tim uslovima precipitira HSA. Nakon centrifugiranja na 5000 rpm tokom 10 minuta, odbacuje se supernatant, a talog se rastvara u fosfatnom puferu (0,1 mol/L, pH 7,4). Dobijeni preparat sadrži dosta zaostalog amonijum-sulfata, te se odsoljava višestrukum ispiranjem fosfatnim puferom u centrikonima. Sadržaj izolovanog HSA se određuje Lowry-evom metodom i reagensom bromkrezol-zeleno. Homogenost uzorka proveravana je nativnom poliakrilamidnom gel-elektroforezom.

3.3.3. *Određivanje sadržaja ukupnih proteina i sadržaja HSA*

Sadržaj ukupnih proteina određivan je spektrofotometrijski primenom Biuretskog reagensa u *in vitro* studijama, u kojima je koncentracija HSA preparata bila dostupna u većim količinama, i primenom modifikovane Lowry-eve metode za izolovane uzorke HSA iz seruma pacijenata, potom u pripremama za spektrofluorimetrijske eksperimente i u veoma zamašćenim uzorcima HSA. Sadržaj HSA u serumu, ali i izolovanih preparata HSA, određivan je spektrofotometrijski sa reagensom bromokrezol-zeleno.

Biuretska metoda

Reagens:

- 4,5 g kalijum-natrijum-tartarata,
- 4 g natrijum-hidroksida,
- 1,5 g bakar-sulfat-pentahidrata,
- 2,5 g kalijum-jodida.

Rastvoriti u destilovanoj vodi i dopuniti do 500 mL.

Postupak: U epruvetu se unese 20 μ L uzorka i 1000 μ L biuretskog reagensa. Slepa proba se sastoji od 20 μ L fosfatnog pufera (pH 7,4) i 1000 μ L biuretskog reagensa. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, meri se apsorbancija na 546 nm i koriguje za vrednost apsorbance slepe probe. Standardna prava je konstruisana standardnom serijom rastvora komercijalnog HSA, koncentracija od 1 do 100 mg/mL. Jednačina prave je $y = 0,00517x + 0,00294$ sa koeficijentom korelacije $r = 0,999$. Određivanja su rađena u po tri probe.

Modifikovana Lowry-eva metoda

Modifikacija klasične Lowry-eve metode prema Stoscheck -u iz 1990. godine objavljena je u *Methods in Enzymology* ((Stoscheck 1990)). Modifikacija je veoma pogodna za zamašćene uzorke.

Reagensi:

- Reagens A: Rastvoriti 20 g anhidrovanog natrijum-karbonata u 260 mL destilovane vode, 0,4 g bakar(II)-sulfat-pentahidrata u 20 mL destilovane vode,

0,2 g kalijum-natrijum-tartarata u 20 mL destilovane vode. Rastvore polako spojiti uz konstantno mešanje, kako bi se izbeglo formiranje taloga. Ukupna zapremina rastvora A je 300 mL.

- Reagens B: 1 mol/L rastvor natrijum-hidroksida u destilovanoj vodi,
- Reagens C: 1 % rastvor natrijum-dodecilsulfata (SDS),
- Reagens D: Radni rastvor, koji je stabilan do tri dana, dobija se mešanjem 3 zapremine rastvora A, 1 zapremine rastvora B i 1 zapremine rastvora C (3A + 1B + 1C).
- Reagens E: Rastvor 0,2 N Folin-Čikoltou rastvora. (Dobija se razblaživanjem 10× komercijalnog Folin-Čikoltou rastvora koncentracije 2 N).

Postupak: U epruvetu se unese 400 µL uzorka. Uz konstantno mešanje na vorteksu dodaje se 400 µL radnog rastvora D i potom inkubira 10 minuta na sobnoj temepraturi. Potom se, uz konstantno vorteksiranje, dodaje 200 µL reagensa E i smeša inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon perioda inkubacije meri se apsorbanacija na 750 nm. Standardna prava je konstruisana sa komercijalnim HSA, u opsegu koncentracija od 5 µg/mL do 150 µg/mL. Jednačina prave je $y = 0,00422x + 0,03546$ sa koeficijentom korelacije $r = 0,990$. Svako određivanje je rađeno u po tri probe.

Određivanje koncentracije albumina sa bromkrezol-zelenim

Bromkrezol-zeleno, reagens za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije HSA u krvnoj plazmi ili serumu, je komercijalno dostupan. Spektrofotometrijska metoda se zasniva na vezivanju bromokrezol-zeleno boje za HSA. U radu je korišćen komercijalni reagens, ali i reagens, pripreman u laboratoriji, koji je davao jednake rezultate.

Reagens bromkrezol-zeleno:

- 0,18 g boje bromkrezol-zeleno resuspendovane u 2 mL 99 % etanola,
- 8,82 g natrijum-citrat-dihidrata,
- 5 g dinatrijum-EDTA,
- 1,8 g detergenta Brij 35,
- pH se podesi na 4,2 hlorovodoničnom kiselinom,
- destilovane vode do 1000 mL.

Postupak: U epruvetu se unese 10 μL uzorka i doda se 1000 μL reagensa. Slepa proba se priprema sa 10 μL fosfatnog pufera ($C = 0,1 \text{ mol/L}$, $\text{pH } 7,4$) i iste zapremine reagensa. Inkubacija traje 10 minuta na sobnoj temperaturi i nakon razvijanja boje meri se apsorbancija na 578 nm. Dobijena vrednost apsorbancije koriguje se oduzimanjem vrednosti apsorbancije slepe probe. Standardna prava se konstruiše pomoću komercijalnog HSA, koncentracije od 5 do 60 mg/mL. Dobijena je jednačina prave: $y = 0,01369x + 0,05038$, sa koeficijentom korelacije $r = 0,997$.

3.3.4. Određivanje sadržaja slobodne Cys34 tiolne grupe

Nakon ispiranja, za dalje eksperimente bilo je neophodno odrediti koliki je sadržaj slobodne tiolne grupe. Iz literature je poznato da HSA preparati koji se nalaze na tržištu imaju znatno manji sadržaj slobodne tiolne grupe, što je posledica procesa pripreme HSA iz kombinovanih uzoraka humanog seruma. Naime, jedan od koraka u procesu dobijanja tzv. albuminske frakcije V, koja predstavlja konačni farmaceutski preparat, je višerasovna sterilizacija na $60 \text{ }^\circ\text{C}$, u cilju otklanjanja potencijalnih pirogena u uzorku, i u tom koraku dolazi do značajne oksidacije Cys34 tiolne grupe.

Analitička metoda za određivanje sadržaja slobodne tiolne grupe zasniva se na spektrofotometrijskom merenju proizvoda reakcije 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB reagensa) i tiola u baznoj sredini, metodom koja se u literaturi naziva *Ellman-ova metoda* (Ellman 1959, Bulaj, Kortemme et al. 1998).

Reagensi:

- 1 mol/L Tris pufer $\text{pH } 8,0$,
- 2 mmol/L DTNB:
 - 7,92 mg DTNB,
 - 68 mg natrijum-acetata,
 - destilovana voda do 10 mL
- 0,1 mol/L natrijum-fosfatni pufer $\text{pH } 7,4$

Postupak određivanja: Ukupna zapremina reakcione smeše je 1 mL. U epruvetu se unese 100 μL uzorka, potom 100 μL Tris pufera ($\text{pH } 8,0$), 100 μL reagensa i 700 μL destilovane vode. Slepa proba se sprema na identičan način, samo se umesto 100 μL

uzorka uzima 100 μL fosfatnog pufera (pH 7,4). Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, meri se apsorbancija na 412 nm. Dobijena apsorbancija je korigovana oduzimanjem apsorbancije blanka. Standardna prava za određivanje koncentracije tiola konstruisana je na osnovu standardne serije rastvora cisteina, koncentracija od 0,001 do 1 mmol/L. Jednačina prave je $y = 0,00136x - 0,00935$, sa koeficijentom korelacije $r = 0,999$. Određivanja su rađena u po tri probe.

Vrednost sadržaja tiolne grupe izražavana je kao koncentracija očitana sa standardne prave u mmol/L. Sadržaj tiola je izražavan kao molarni odnos tiola podeljen molarnom koncentracijom HSA i on predstavlja odnos redukovanog HSA (merkaptalbumina) i oksidovanih formi HSA, budući da je na molekulu HSA prisutna samo jedna tiolna grupa koja potiče od Cys34 ostatka.

3.3.5. Određivanje kinetičke konstante reakcije Cys34-SH sa DTNB-om

Kinetika reakcije Cys34-SH i DTNB-a praćena je spektrofotometrijski kao što je opisano u određivanju sadržaja slobodne tiolne grupe, sa tom razlikom što je reakcija praćena sve vreme inkubacije rastvora HSA sa DTNB-om. Uzorak HSA preparata (100 μL) se pomeša sa rastvorom Tris pufera i dopuni vodom kao što je opisano u delu o kvantifikaciji tiolne grupe. Reakciona smeša se inkubira na 37 °C tokom 5 minuta, a potom se prenese u kivetu spektrofotometra, doda se rastvor DTNB-a (2 mmol/L) i brzo promeša. Na svakih 10 s beleži se vrednost apsorbancije na 412 nm tokom prvih 5 minuta, a potom na 30 s do 30 minuta. Sadržaj tiola koji nije izreagovao u svakom vremenskom intervalu dobija se oduzimanjem konačne vrednosti nakon 30 minuta od svake prethodne vrednosti. U račun se unose korekcije za blank uzorka i blank DTNB-a. Reakcioni profil se, ukoliko reakcija prati kinetiku reakcije pseudo-prvog reda, linearizuje logaritmovanjem koncentracije tiola, tako da se dobija semilogaritamski dijagram $\ln C_{\text{SH}} = \ln C_{\text{SH}0} - kt$.

3.3.6. Izolovanje masnih kiselina iz preparata ribljeg ulja

U cilju ispitivanja vezivanja smeše masnih kiselina, prisutnih u ribljem ulju, izolovane su masne kiseline iz komercijalnog preparata ribljeg ulja Alkakaps Omega 3 proizvođača Alkaloid (BJR Makedonija) u obliku želatinoznih kapsula. Prema proizvođačkoj specifikaciji kapsule su ispunjene prečišćenim ribljim ulje bakalara sa etil-estrima masnih kiselina, od toga 165 mg eikozapentenske kiseline (EPA), 110 mg dokozaheksenske kiseline (DHA) i 5 mg vitamina E (u obliku tokoferil-acetata).

Ekstrakcija masnih kiselina iz pomenutog preparata rađena je saponifikacijom, udaljavanjem nesaponifikovanih delova i potom oslobađanjem masnih kiselina iz sapuna.

Reagensi:

- 0,3 mol/L kalijum-hidroksid u 90 % etanolu,
- 4 mol/L hlorovodonična kiselina,
- dietiletar,
- n-heksan.

Postupak: Uljasti sadržaj gel-kapsula prenese se u balon zapremine 250 mL i na svakih 50 mg ulja dodaje se 2 mL rastvora kalijum-hidroksida. Doda se par kuglica za ključanje, namesti se refluksni kondenzator i smeša ključa 60 minuta na 80 °C. Kada se smeša ohladi, dodaje se 50 – 100 mL destilovane vode, snažno promućka i prenese u levak za odvajanje pogodne zapremine. Ispiranje nesaponifikovanih delova obavlja se sa nekoliko ekstrakcija sa po 20 mL dietiletra, pri čemu se gornji organski sloj odbacuje. Potom se vodena faza zakiseli rastvorom hlorovodonične kiseline do pH 1 – 2. Rastvor se naglo zamuti usled izdvajanja masnih kiselina iz kalijumovih soli. Ekstrakcija oslobođenih masnih kiselina obavlja se sa 4 ekstrakcije od po 20 mL n-heksana. Gornje n-heksanske faze se spajaju, potencijalno uneta voda se uklanja dodavanjem anhidrovanog natrijum-sulfata, potom se uparava polako na rotacionom vakuum-uparivaču uz blago zagrevanje, kako bi se sprečila termička razgradnja viših polinezasićenih masnih kiselina. Čistoća i odnos masnih kiselina u preparatu provereni su GC-MS tehnikom.

3.3.7. Ekstrakcija masnih kiselina iz kompleksa sa HSA i priprema za GC analizu

Analiza MK vezanih za HSA gasnom hromatografijom zahteva odvajanje MK iz vodenog rastvora i potom prevođenje u odgovarajuće metil-estre, (FAME, od eng. *Fatty acids methyl esters*). Uobičajeni postupak za izolovanje svih nepolarnih molekula iz biološkog uzorka je priprema Folčovog ekstrakta.

Reagensi:

- Folčov rastvor za ekstrakciju: hloroform/metanol = 2/1 (v/v).

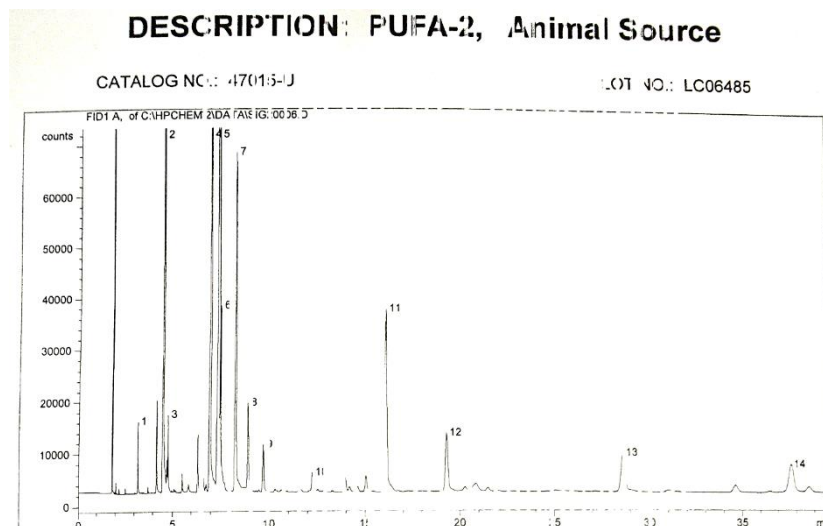
Postupak: Uzorku od 100 do 250 μL preparata HSA, ili seruma, dodaje se 1000 μL Folčovog reagensa. Smeša se snažno promućka na vorteksu tokom 1 minuta. Potom se dobijena emulzija centrifugira na 5000 rpm tokom 10 minuta. Donja hloroformska faza odvoji se i upari do suva u struji azota.

Transesterifikacija - dobijanje FAME: U upareni ekstrakt dodaje se 2 mL n-heksana i promućka. Zatim se dodaje 0,2 mL 2 mol/L natrijum-hidroksida u metanolu. Epruvete sa teflonskim zatvaračem se ostave u termostatu na 85 °C tokom jednog sata. Potom se dodaje 0,2 mL 1 mol/L sumporne kiseline u metanolu i epruvete se termostatiraju tokom dva sata na 85 °C. Nakon hlađenja smeša se centrifugira na 3000 rpm, odvoji se heksanski sloj i upari do suva u struji azota.

3.3.8. Analiza metil-estara masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom

Dobijeni metil-estri (FAME) analizirani su na gasnom hromatografu, sa plameno-jonizacionim detektorom Shimadzu GC 2014 (Kyoto, Japan), na kapilarnoj koloni Restek-2330 (polietilenglikolna stacionarna faza) dužine 60 m i prečnika 0,20 mm. Uzorak metil-estara rastvara se u 10 μL zapremini n-heksana i pomoću mikrošprica, injektuje od 0,5 do 1,0 μL rastvora u aparat. Protok nosećeg gasa (helijuma) je 11 mL/min, protok vazduha 500 ml/min, a vodonika 50 mL/min. Uređaj je povezan sa računarnom, a programom Lab Solutions podaci razdvajanja se sakupljaju i obrađuju. Optimizacija za analizu masnih kiselina postignuta je primenom standardnog premiksa masnih kiselina Pufa-2 mix (Supelco) (Slika 16), a identifikacija masnih kiselina u uzorcima upoređivanjem retencionih vremena pikova uzorka sa retencionim vremenima

standarda masnih kiselina . Kvantifikacija masnih kiselina rađena je upoređivanjem površina pikova metil-estara masnih kiselina sa površinom internog standarda masne kiseline C13:0 poznate koncentracije.



Slika 16 - Hromatogram metil-estara masnih kiselina iz komercijalnog premiksa PUFA-2 mix (Supelco). Hromatografski profil odgovara numerisanim vrednostima pikova: (1.) C14:0, (2.) C16:0, (3.) C16:1n7, (4.) C18:0, (5.) C18:1n9, (6.) C18:1n7, (7.) C18:2n6, (8.) C18:3n6, (9.) C18:3n3, (10.) C20:1n9, (11.) C20:4n6, (12.) C20:5n3, (13.) C22:4n6, (14.) C22:6n3

3.3.9. Ekstrakcija masnih kiselina iz kompleksa sa HSA za analizu tankoslojnom hromatografijom

Brza kvantifikacija ukupnih MK vezanih za HSA rađena je kvantitativnom tankoslojnom hromatografijom (qTLC). Metoda je razvijena i optimizovana za potrebe pomenute analitike.

Reagensi:

- Rastvor bakar(II)-sulfata (0,5 mol/L) i fosforne kiseline (1 mol/L),
- Smeša n-heptan/hloroform (4/1 v/v).

Postupak: Alikvot od 250 μ L rastvora izolovanog HSA poznate koncentracije unese se u Eppendorf mikrotubu, doda se 800 μ L kiselog rastvora bakar(II)-sulfatna, snažno se

vorteksira, potom se doda 100 μ L smeše n-heptan/hloroform, vorteksira i inkubira u toku 10 minuta. Nakon perioda inkubacije mikrotube se centrifugiraju na 10000 rpm tokom 10 minuta. Gornja heptan-hloroformska faza se odvoji pipetiranjem mikropipetom (oko 80 μ L je moguće lako odvojiti bez mešanja faza) i taj ekstrakt se koristi za dalju qTLC analizu.

Standardna serija za, konstruisanje standardne prave za denzitometrijsku analizu masnih kiselina qTLC-om, pripremana je na identičan način osim što su umesto 250 μ L rastovra HSA, odmeravane odgovarajuće zapremine 50 mmol/L rastvora stearinske kiseline u etanolu, i zapremina do 250 μ L dopunjavana fosfatnim puferom (0,1 mol/L, pH 7,4).

3.3.10. Analiza masnih kiselina tankoslojnom hromatografijom

Priprema TLC pločica. U radu su korišćene komercijalne silika-gel pločice (TLC Silica gel 60 F₂₅₄) na aluminijumskoj podlozi. Sečene su male ploče širine 7,5 cm i visine 3,0 cm. Pločice su potom aktivirane u sušnici na 120 °C u trajanju od 30 minuta, potom čuvane do analize u eksikatoru iznad anhidrovanog kalcijum-hlorida. Pločice su optimizovane za brzi rad u pomenutim uslovima.

Nanošenje uzoraka i razvijanje TLC pločica. Dobijeni heptan-hloroformski ekstrakt MK nanošen je na pločice mikrošpicem, kao tačke od po 5 μ L uzorka na rastojanju 5 mm od početka pločice i međusobno udaljene 5 mm. Pločice su se nalazile na toploj ploči temperature oko 50 °C, što je omogućavalo momentalno isparavanje rastvarača prilikom kontakta sa silika-gelom. Svaki uzorak je nanošen u duplikatu ili u triplikatu zavisno od vrste analize.

Pločice su razvijane u pogodnim kadicama, za TLC hromatografiju, malih dimenzija. Sistem rastvarača za razvijanje sastoji se od smeše n-heptan/hloroform/sirćetna kiselina u odnosu 5 : 3 : 0,3 (v/v/v). Razvijanje traje oko 1,5 minuta. Nakon kraćeg atmosferskog sušenja (oko 1 min.) pločice se dodatno suše kratkim strujanjem vrelog vazduha iz pištolja za vreli vazduh.

Bojenje TLC pločica. U radu je isprobano više različitih načina bojenja TLC pločica, počev od opštih reagenasa za izazivanje TLC ploča poput sumporne kiseline, sumporne

kiseline/vanilina, do specifičnih bojenja za MK, bojama kao što su timol-plavo, bromokrezol-zeleno i specifičnim bojama za nepolarna jedinjenja, Sudan Black i Sudan Red. U Diskusiji rezultata navedene su prednosti i mane pojedinačnih pristupa. Opšte bojenje potapanjem TLC pločice u 8 % rastvor sumporne kiseline u 99 % etanolu i potom zagrevanje do pojave mrlja se pokazalo kao najpogodnije u daljoj kvantifikaciji masnih kiselina denzitometrijskom analizom.

3.3.11. Skeniranje TLC pločica i digitalna analiza slike denzitometrijskim proračunom

Obojene TLC pločice su skenirane na običnom kancelarijskom skeneru (HP ScanJet 3800) pri rezoluciji od 600 dpi, bez primene ikakvih metoda obrade slike (izoštavanje, promena kontrasta) koje može primeniti upravljački program skenera. Slike su sačuvane kao slike u boji RGB sa 8-bitnim kanalima boje, primenom LZW (Lempel-Ziv-Welch algoritma za kompresiju podataka bez gubitaka) i sačuvane u TIFF datotekama. Specifično softversko rešenje za denzitometrijsku analizu takvih slika je razvijeno u R statističkom sistemu i programskom jeziku. Softver je otvorenog koda pod GNU licencom i nakon pregleda i testiranja od strane R tima postavljen je na CRAN repozitorijumu za preuzimanje kao zvanični R paket. Dostupan je na adresi: <https://cran.r-project.org/web/packages/qtlc/index.html>.

3.3.12. Elektroforetska analiza

Provera stepena prečišćenosti HSA rađena je nativnom poliakrilamidnom gel-elektroforezom (PAGE). Modifikacije HSA reakcijom karbonilacije metilglioksalom praćene su denaturišućom SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom (SDS PAGE).

Nativna PAGE

Monomerni rastvori:

Gel za razdvajanje (eng. separating)

- 40 % T, 5 % Bis, za 10 mL:
- 3,8 g akrilamida,

- 0,2 g bisakrilamida,
- dopuniti vodom do 10 mL

Gel za koncentrovanje (eng. stacking)

- 6,25 % T, 20 % Bis, za 10 mL:
- 0,5 g akrilamida,
- 0,125 g bisakrilamida.

Puferski rastvori:

4× pufer za razdvajanje (947 mmol/L Tris, pH 8,48), za 25 mL:

- 2,87 g Tris,
- podesiti pH na 8,48, dopuniti vodom do 25 mL.

4× pufer za koncentrovanje (158 mM Tris, pH 6,9), za 25 mL:

- 0,48 g Tris,
- podesiti pH na 6,9, dopuniti vodom do 25 mL.

Donji (anodni) pufer (63 mmol/L Tris, pH 7,47), za 500 mL:

- 3,78 g Tris,
- podesiti pH na 7,47 i dopuniti vodom do 500 mL.

Gornji (katodni) pufer (37,6 mmol/L Tris, 40 mmol/L glicin, pH 8,89), za 500 mL:

- 2,28 g Tris,
- 1,5 g glicina,
- podesiti pH na 8,89 i dopuniti vodom do 500 mL.

Boja za bojenje gela:

- 0,1 g CBB G-250,
- 40 mL metanola,
- 7 mL sirćetne kiseline,
- dopuniti vodom do 100 mL.

Rastvor za obezbojavanje:

- 50 mL metanola,
- 10 mL sirćetne kiseline,
- dopuniti vodom do 100 mL.

Rastvor za čuvanje gela:

- 5 mL metanola,

- 7 mL sirćetne kiseline,
- dopuniti vodom do 100 mL.

Sheme razlivanja za gelove različitog stepena umreženosti:

Za 10 mL, 10 % T gel:

- 2,5 mL monomernog rastvora (40 % T),
- 2,5 mL pufera (pH 8,48),
- 4,9 mL destilovane vode,
- 100 µL 10 % amonijum-persulfata,
- 7 µL TEMED (tetrametiletildiamin).

Za 10 mL, 9,5 % T gel:

- 2,25 mL monomernog rastvara (40 % T),
- 2,75 mL pufera (pH 8,48),
- 4,9 mL destilovane vode,
- 100 µL 10 % amonijum-persulfata,
- 7 µL TEMED.

Gel za koncentrovanje (stacking gel), za 5 mL:

- 2,5 mL monomernog rastvora (6,25 % T),
- 1,25 mL pufera (pH 6,9),
- 1,2 mL destilovane vode,
- 35 µL 10 % amonijum-persulfata,
- 5 µL TEMED.

Pufer za pripremanje uzoraka, za 5 mL:

- 5 mL pH 6,8 pufera,
- 5 mL 86 % glicerola,
- 50 µL 10 % bromfenol plavog (u 99 % etanolu).

SDS PAGE

Monomerni rastvor (30 % T, 2,7 % C):

- 58,4 g akrilamida,
- 1,6 g bisakrilamida,

- dopuniti vodom do 200 mL.

Puferski rastvori:

Za gel za razdvajanje (1,5 mol/L Tris, pH 8,8):

- 36,30 g Tris,
- podesiti pH na 8,8 i dopuniti vodom do 200 mL.

Za gel za koncentrovanje (0,5 mol/L Tris, pH 6,8):

- 6,0 g Tris,
- podesiti pH na 6,8 i dopuniti vodom do 100 mL.

Rastvor SDS-a (10 % m/v):

- 10,0 g SDS,
- dopuniti vodom do 100 mL.

Rastvor inicijatora (10 % m/v amonijum-persulfat):

- 0,2 g amonijum-persulfata,
- dopuniti vodom do 2 mL.

Shema razlivanja za gelove različitog stepena umreženosti:

Za 8 % gel:

- 4,6 mL destilovane vode,
- 2,5 mL Tris pufera (pH 8,8),
- 2,7 mL monomernog rastvora,
- 100 μ L 10 % SDS,
- 6 μ L TEMED,
- 100 μ L inicijatora.

Za 10 % gel:

- 4,0 mL destilovane vode,
- 2,5 mL Tris pufera (pH 8,8),
- 3,3 mL monomernog rastvora,
- 100 μ L 10 % SDS,
- 4 μ L TEMED,
- 100 μ L inicijatora.

Gel za koncentrovanje (stacking gel) 5 %:

- 2,7 mL destilovane vode,

- 500 μ L Tris pufera (pH 6,8),
- 670 μ L monomernog rastvora,
- 40 μ L 10 % SDS,
- 4 μ L TEMED,
- 40 μ L inicijatora.

Rastvori za bojenje i obezbojavaje su identični kao kod nativne PAGE elektroforeze.

3.3.13. Priprema uzoraka HSA za in vitro istraživanja

Pri normalnim fiziološkim uslovima, 70 – 80 % HSA u cirkulaciji je u obliku merkaptalbumina, tj. sa redukovanom Cys34 tiolnom grupom. Napomenuto je već da je u komercijalnim preparatima HSA stepen oksidacije Cys34-SH izuzetno visok, te da je svega oko 30 % ostatka Cys34 u redukovanom obliku. Stoga je, u cilju simuliranja fizioloških uslova, oksidovani oblik komercijalnog HSA bilo neophodno prvo redukovati tako da udeo merkpto-albumina bude iznad 70 %.

Takođe, usled obrade albumina, broj masnih kiselina po molekulu komercijalnog HSA je različit, što je potvrđeno GC analizom MK profila. U tu svrhu za eksperimente sa kontrolisanim brojem i vrstom MK vezanih za HSA, komercijalni HSA je prvo potpuno odmašćen, a zatim kontrolisano zamašćivan odgovarajućim MK, ili smešom MK u slučaju preparata ribljeg ulja.

3.3.13.1. Redukcija komercijalnog HSA

Komercijalni HSA, korišćen u istraživanjima, sadrži između 0,3 i 0,4 mol -SH/mol HSA. Za potrebe eksperimenata sadržaj HSA-SH je povećavan redukcijom oksidovanih formi HSA u kontrolisanim uslovima sa ditionitrolom (DTT).

Pri uslovima proste redukcije, primenom molarnog odnosa DTT:HSA 1:1 i višim odnosima u korist DTT-a, kako to predlažu neki autori (Lee and Hirose 1992), dolazi verovatno do delimičnog razvijanja strukture HSA, jer sadržaj HSA-SH tim uslovima značajno prelazi 100 %.

U laboratoriji je specijalno stoga, za potrebe ovog eksperimentalnog modela, razvijena metoda za redukciju HSA primenom DTT-a, tako da se ne poremeti struktura HSA, a

opet postigne zadovoljavajuće povećanje udela merkapto-albumina. Metoda se zasniva na određivanju sadržaja slobodnih, redukovanih tiolnih grupa i ukupnog HSA, a potom se za redukciju primeni količina DTT-a koja odgovara sadržaju oksidovanog oblika HSA-SH.

Postupak: Pre redukcije odredi se sadržaj HSA-SH grupa u komercijalnom HSA i ukupna koncentracija HSA, a iz razlike izračuna sadržaj oksidovanog oblika HSA. Odgovarajuća količina HSA se pomeša sa DTT tako da molarni odnos oksidovanih grupa HSA i DTT-a (rastvorenog u 0,1 mol/L fosfatnom puferu, pH 7,4) bude 1:1. Smeša se inkubira jedan sat na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Potom se smeša prenese u centrikon i ispira od zaostalog DTT-a šest puta fosfatnim puferom (0,1 mol/L, pH 7,4) sa punom zapreminom centrikona. Redukovanom HSA se vrati zapremina na početnu vrednost, odredi koncentracija HSA i tiolnih grupa, i koncentracija HSA svede na 1,5 – 1,0 mmol/L HSA. Pripremljeni rastvor HSA se čuva u frižideru u dobro zatvorenoj boci, bez nadslojenog vazduha. Pri ovim uslovima HSA je stabilan oko dva dana bez značajnijih promena odnosa mol-SH/mol HSA.

3.3.13.2. Odmašćivanje HSA

Komercijalni rastvor HSA, iako je tokom postupka obrade ispran od većine liganada, sadrži izvesnu količinu vezanih masnih kiselina. Predloženo je više metoda za gotovo potpuno odmašćivanje HSA, a u radu je primenjena metoda odmašćivanja sa aktivnim ugljem u kiseloj sredini (Chen 1967), koja je i najviše citirana u literaturi.

Postupak: Komercijalni rastvor HSA (ne više od 5 mL zbog povećanja gubitaka kada se radi sa većim zapreminama) se duplo razblaži destilovanom vodom. Potom se, uz konstantno mešanje, u rastvor HSA dodaje aktivni uglj (0,1 g po 1 mL nerazblaženog rastvora komercijalnog HSA). Kada se dobije stabilna i homogena smeša, podesi se pH rastvora na 3,0 upotrebom HCl (3 mol/L). Rastvor se prenese u ledeno kupatilo i uz konstantno mešanje inkubira jedan sat. Nakon perioda inkubacije, rastvor se razlije u Eppendorf mikrotube i centrifugira 15 minuta na 10000 rpm. Rastvori iznad taloga se prelivau u nove mikrotube i centrifugiranje ponavlja sve do prestanka izdvajanja vidljivog taloga aktivnog uglja. Potom se rastvori spoje i pH se vrati na 7,0 pomoću 1 mol/L NaOH. Zatim se HSA ispere nekoliko puta fosfatnim puferom (pH 7,4, 0,1

mol/L) u centrikonima sa porama od 30000 Da, i odredi koncentracija HSA u koncentrovanom uzorku.

3.3.14. Vezivanje masnih kiselina za odmašćeni HSA

Da bi se postiglo maksimalno vezivanje, odnosno zasićenje HSA odgovarajućom MK, zamašćivanje je vršeno inkubiranjem HSA sa znatno višim koncentracijama slobodnih MK.

Postupak:. Rastvoru odmašćenog HSA (u kome je prethodno određena njegova koncentracija) dodaje se odgovarajuća zapremina 50 mmol/L rastvora MK u 99 % metanolu, tako da odnos molova MK/HSA bude 20/1. Ukupna zapremina rastvora se podesi i dopuni fosfatnim puferom (0,1 mol/L, pH 7,4) da koncentracija HSA u smeši bude 0,5 mmol/L. Smeša se, uz povremeno mešanje, inkubira na 37 °C tokom jednog i po sata, a potom . Nakon inkubacije smeša se centrifugira na 10000 rpm tokom 15 minuta, a potom se odvoji rastvor od sloja masnih kiselina. Rastvor zamašćenog HSA se prenese u centrikone, dopuni fosfatnim puferom do maksimalne vrednosti zapremine centrikona i koncentruje do početne zapremine rastvora HSA. Nakon određivanja koncentracije HSA zapremina se svede na vrednost pri kojoj je koncentracija HSA od 1,0 do 1,5 mmol/L.

3.3.15. Priprema uzoraka HSA za reakciju karbonilacije metilglioksalom

Uzorci HSA preparata, redukovano, odmašćenog i kontrolisano zamašćenog, razblaženi su fosfatnim puferom (0,1 mol/L pH 7,4) tako da u konačnoj zapremini koncentracija HSA bude 0,5 mmol/L. Koncentracija rastvora metilglioksala u fosfatnom puferu podešena je tako posle mešanja sa rastvorom HSA konačna koncentracija metilglioksala u uzorku bude 10 mmol/L. Smeša HSA i MG se inkubira na 37 °C tokom vremena počev od trenutka dodavanja rastvora metilglioksala. Višak metilglioksala se uklanja ispiranjem karbonilovanih derivata HSA u centrikonu, tako što se skoncentrovana zapremina rastvora (oko 1,5 mL) razblažuje do 15 mL, i ponovo centrifugira. Ispiranje se ponavlja pet puta.

3.3.16. Određivanje stepena karbonilovanja HSA

Stepen karbonilovanja amino-, guanidino- i Cys34 tiolne grupe HSA praćen je modifikovanom spektrofotometrijskom metodom sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) (Mesquita, Oliveira et al. 2014). Metoda omogućava direktno merenje apsorbancije proizvoda reakcije DNPH i karbonila na proteinu u rastvoru, bez prethodnog taloženja i ispiranja proteina, ekstrakcije viška DNPH, te ponovnog resuspendovanja proteina u rastvoru uree ili guanidijum-hidrohlorida, kako je to predviđala originalna metoda po Levine-u i saradnicima (Levine, Garland et al. 1990).

Reagensi:

- 10 mmol/L 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), 0,5 mol/L fosforna kiselina,
- 6 mol/L natrijum-hidroksid.

Postupak: Zapremina od 400 μ L rastvora HSA poznate koncentracije (oko 1 mg/mL) prenese se u epuветu, potom se doda 400 μ L rastvora DNPH i nakon mućkanja smeša inkubira 10 minuta. Potom se dodaje 200 μ L rastvora NaOH i zatim inkubira još 10 minuta. Slepа probа se pripremana isti način, sa 400 μ L fosfatnog pufera (pH 7,4, 0,1 mol/L) umesto rastvora proteina. Nakon inkubacije meri se apsorbancija na 450 nm. Koncentracija ukupnih karbonila računa se na osnovu ekstinkcionog koeficijenta 22308 mol⁻¹ L⁻¹ cm⁻¹ (Mesquita, Oliveira et al. 2014).

3.3.17. Priprema uzoraka HSA za ispitivanja na spektrofluorimetru

Molekul HSA poseduje samo jedan triptofanski ostatak Trp214 koji ekscitacijom na 295 nm emituje fluorescenciju na oko 340 nm, zavisno od vrste liganda koji je vezan za HSA, ili na višim talasnim dužinama u slučaju denaturacije molekula HSA. Fluorescentni spektri su snimani na spektrofluorimetru Fluoromax-4 Jobin Yvon (Horriba Scientific, Japan). Koncentracija HSA je, pre snimanja spektara, podešena na vrednost od 0,5 μ mol/L razblaživanjem 0,1M fosfatnim puferom (pH 7,4) u superčistoj vodi. Za snimanje je upotrebljena kvarcna kiveta za spektrofluorimetar, optičkog puta 1 cm. Svako snimanje je rađeno kao dva skena uz širinu slita 5 nm, a dobijeni spektri su korigovani oduzianjem spektra fosfatnog pufera koji je upotrebljen za razblaživanje.

3.4. Statistička obrada podataka

U obradi i grafičkom prikazivanju podataka korišćeno je R statističko okruženje (R fondacija za Statističke proračune, Beč, Austrija (Team 2015)) 64-bit verzija 3.1.2 („Pumpkin Helmet“) na Slackware Linux operativnom sistemu (64-bit verzija 14.1).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Dostupnost/reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA

U prethodnim ispitivanjima karbonilacije HSA metil-glioksalom dokazan je visoki stepen modifikovanja guanidino- i amino-grupa ostataka Lys i Arg na površini molekula HSA metilglioksalom (Acimovic, Jovanovic et al. 2013). Budući da je sadržaj ovih grupa znatno veći (83 ostatka Lys i Arg) u odnosu na samo jednu tiolnu grupu ostatka Cys34, bilo je neophodno ispitati u kojoj meri se modifikuje ovaj ostatak i da li je ta reakcija jednako brza kao reakcije ostataka Lys i Arg. Pored navedenog, činjenice da se tiolna grupa nalazi u džepu, da ima malu izloženost/dostupnost rastvaraču (Poglavlje 2.6.), da se njena izloženost može menjati pri vezivanju različitih liganada za molekul HSA (Jovanovic, Penezic-Romanjuk et al. 2013), takođe su ukazale na značaj ispitivanja karbonilacije tiolne grupe. Računski dobijeni podaci o stepenu izloženosti pojedinačnih aminokiselinskih ostataka prema rastvaraču dobijeni su primenom online programa ASAView (dostupnog na adresi: <http://www.abren.net/asaview/>). Program AsaView koristi ASA (eng. Accessible surface area) podatke dobijene upotrebom DSSP (eng. Define Secondary Structure of Proteins) programa za predviđanje vodoničnih veza u proteinima, kristalografskih podataka preuzetih iz PDB datoteke, a potom prevodi u relativne procenete pogodnije za dalju statističku analizu (Ahmad, Gromiha et al. 2004). Obradeni podaci za dostupnost ostataka Cys34 kod različitih MK vezanih za HSA, kao i ostataka arginina prikazani su u Tabeli 2.

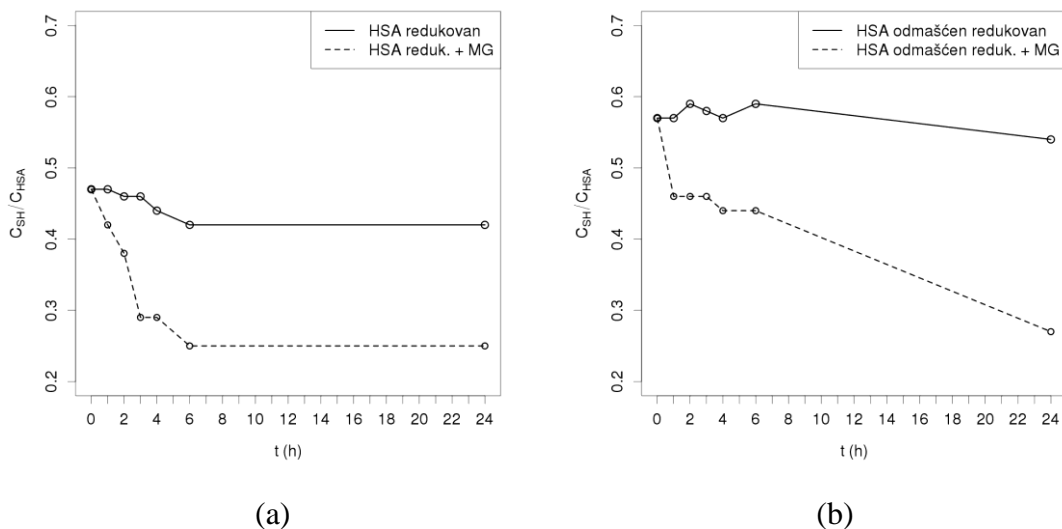
Tabela 2 – Stepen izloženosti aminokiselinskih ostataka (AK) cisteina (C34) i arginina (R) rastvaraču (u procentima). HSA: albumin bez vezanih MK (PDB ID 1AO6); DKA: HSA sa vezanom kaprinskom kiselinom (DKA, C10:0, PDB ID 1E7E); DAO: HSA sa laurinskom kiselinom (DAO, C12:0, PDB ID 1E7F); MYR: HSA sa miristinskom kiselinom (MYR, C14:0, PDB ID 1E7G); PLM: HSA sa palmitinskom kiselinom (PLM, C16:0, PDB ID 1E7H); STE: HSA sa stearinskom kiselinom (STE, C18:0, PDB ID 1E7I); OLA: HSA sa oleinskom kiselinom (OLA, C18:1n9, PDB ID 1GNI)

AK	HSA	DKA	DAO	MYR	PLM	STE	OLA
C34	0,7	2,1	4,2	5,6	4,2	4,9	3,5
R10	6,4	17,9	21,4	18,8	23,1	16,2	17,5
R81	46,9	55,9	62	62,9	62	61,6	60,3
R98	72,6	10,5	9,6	9,6	8,7	10,9	8,7
R114	22,4	79,9	70,3	84,3	80,3	62	91,7
R117	29,5	42,4	48	41	45,4	45,4	42,4
R144	31,3	10,9	9,6	8,7	10,5	10	9,6
R145	0	20,1	21	17,9	17	20,1	18,8
R160	25,4	32,3	31	32,3	32,7	46,7	45
R186	34,9	31,9	13,1	43,2	28,4	25,3	34,9
R197	29,2	27,5	62,9	28,4	28,8	56,8	37,1
R209	36,8	53,7	55,4	56,3	56,3	52	56,3
R218	7,8	24,9	24,4	27,1	19,2	31,4	23,1
R222	0	21	22,3	18,8	23,6	15,3	19,6
R257	38,1	22,7	25,3	26,6	21	20,1	21,4
R336	9,4	15,3	12,2	11,8	11,8	10,9	10,9
R337	0	17	13,5	16,6	17	15,3	18,3

Nastavak tabele 2

R348	0,5	10,9	12,7	10,9	11,8	12,2	9,2
R410	0,5	37,5	34,9	32,7	32,7	26,6	37,1
R428	11,7	24	23,1	20,5	16,6	18,3	11,8
R445	59	24	24,9	20,1	26,2	22,7	24,9
R472	8,5	21	24,9	24,4	27,5	28,8	25,8
R484	14,3	7	14	15,3	7	6,1	6,5
R485	47,8	15,7	19,2	17	17,9	21	18,3
R521	65,1	23,6	9,2	40,2	25,3	38	35,4

Računski dobijeni podaci pokazuju da se izloženost ostataka Cys i Arg znatno razlikuje (od 0 do 72 %) i da se u nekim slučajevima značajno menja pri vezivanju masnih kiselina za HSA. Samim tim, vezivanje liganada za HSA može znatno da utiče na stepene karbonilacije ostataka amino-kiselina i na reaktivnost bočnih ostataka. Promena reaktivnosti tiolne grupe ostatka Cys34 mogla bi uticati na njen kapacitet kao hvatača karbonilnih jedinjenja, ali i kao antioksidanta. Dostupnost/reaktivnost Cys34 tiolne grupe proverena je inkubiranjem 0,5 mmol/L rastvora redukovanog HSA (bez i sa prethodnim odmaščivanjem) sa 10 mmol/L metilglioksalom na 37 °C u toku 24h, uzorkovanjem alikvota smeše u vremenskom intervalima i određivanjem sadržaja neizreagovane tiolne grupe. Promena sadržaja tiolnih grupa (mol SH/mol HSA) tokom vremena inkubacije prikazana je na slici 17.



Slika 17 - Promena sadržaja tiolnih grupa tokom 24 h inkubacije HSA (0.5 mmol/L) na 37 °C, sa i bez metilglioksala (10 mmol/L). (a) Kontrola HSA: HSA preparat je ispran fosfatnim puferom, redukovano DTT-om i koncentracija je svedena na 0,5 mmol/L; (b) Odmašćeni HSA: HSA preparat je odmašćen, redukovano DTT-om i koncentracija je podešena na 0,5 mmol/L.

Sa grafika 17a uočava se da sadržaj slobodne tiolne grupe na neodmašćenom HSA značajno opada tokom inkubacije sa metilglioksalom u odnosu na sadržaj kontrolne probe. Nakon 24 h inkubacije smanjenje sadržaja iznosi 50 %, odnosno 10 %, respektivno. Promena sadržaja je još izraženija kod preparata HSA koji je odmašćen i redukovano, gde se u reakciji sa metilglioksalom sadržaj tiolne grupe smanjuje preko 50 %, a u kontrolnoj probi svega oko 5 % (Slika 17b). Takođe, kod HSA sa vezanim masnim kiselinama (koji odgovara HSA u cirkulaciji) primećuje se da je reakcija oksidacije/karbonilovanja tiolne grupe pri inkubaciji sa i bez prisustva metilglioksala najizraženija tokom prvih 6 h i potom gotovo bez promene teče do 24 h. Sa druge strane, tiolna grupa preparata HSA, koji je i odmašćen i redukovano, reaguje tokom svih 24 h inkubacije. Dobijeni rezultati se mogu objasniti promenom dostupnosti aminokiselinskih ostataka koje podležu reakciji sa metilglioksalom. Kod odmašćenog HSA, usled manje dostupnosti ostataka amino-kiselina, reakcija se odvija sporije i verovatno u etapama, tj. kako se molekul HSA modifikuje metilglioksalom tako se

značajnije menja i njegova struktura i dostupnost tiolne grupe, za razliku od HSA zasićenog masnim kiselinama gde je dostupnost ostataka u prvih 6 h inkubacije veća.

Budući da je 24-časovno praćenje toka reakcije u pokazalo da se promena sadržaja Cys34 tiolne grupe tokom inkubacije sa metilglioksalom značajno menja kada su za HSA vezane masne kiseline, bilo je potrebno proveriti da li se stabilnost sadržaja ove grupe održava kod uzoraka HSA koji su inkubirani sa različitim MK u kontrolisanim uslovima. Tabela 3 prikazuje početne i krajnje vrednosti sadržaja tiolne grupe odmašćenog i redukovano HSA, pri inkubaciji bez i u prisustvu metilglioksala, kao i odmašćenog, redukovano, pa zamašćenog HSA masnim kiselinama iz ribljeg ulja (sa kojima je pad sadržaja bio najizraženiji). Niži početni sadržaji tiolnih grupa zamašćenih HSA preparata su posledica obrade preparata posle vezivanja masnih kiselina, odnosno ispiranja i podešavanje koncentracije HSA na 0,5 mmol/L, kada neminovno dolazi do delimične oksidacije tiolne grupe.

Rezultati pokazuju da se sadržaj tiolne grupe značajno menja tokom inkubacije HSA (bez i sa vezanim masnim kiselinama ribljeg ulja) sa metilglioksalom, odnosno da se tiolna grupa značajno karboniluje (smanjenje od 56,7 % za odmašćeni, odn. 75 % za kompleks sa MK iz ribljeg ulja) i da je procenat karbonilacije znatno veći od izračunate dostupnosti. Takođe je važno istaći da inkubacija kontrolnih uzoraka HSA (bez prisustva metil-glioksala) dovodi do oksidacije tiolne grupe i da je oksidacija izraženija u slučaju kompleksa HSA-masna kiselina.

Tabela 3 – Smanjenje sadržaja Cys34 tiolne grupe posle 24-časovne inkubacije odmašćenog HSA (0.5 mmol/L) (bez i sa vezanim masnim kiselinama iz ribljeg ulja) na 37 °C, sa i bez metilglioksala (10 mmol/L). Svi uzorci HSA su posle odmašćivanja redukovani sa DTT u cilju povećanja početnog sadržaja tiolnih grupa.

Uzorak	C_{SH}/C_{HSA}		Smanjenje sadržaja SH
	0 h	24 h	%
HSA odmašćen redukovano	0,90	0,79	12,2
HSA odmašćen redukovano + MG	0,90	0,39	56,7
HSA odmašćen redukovano + MK izolovane iz ribljeg ulja	0,84	0,50	40,5
HSA odmašćen redukovano + MK izolovane iz rib. ulja + MG	0,84	0,21	75,0

4.2. Uticaj vezivanja masnih kiselina za humani serum-albumin na reaktivnost tiolne grupe Cys34

Cys34 tiolna grupa humanog serum-albumina nije direktno uključena u vezivanje masnih kiselina. Međutim, pokazano je da vezivanje masnih kiselina za HSA dovodi do promene kinetike reakcije tiolne grupe sa vodonik-peroksidom i peroksi-nitritom (Torres, Turell et al. 2012), što ukazuje na mogućnost modulacije njenih antioksidativnih svojstva. Sa druge strane, patološki uslovi za koje je karakteristična hiperlipidemija i karbonilni stres mogli bi, kroz promenu reaktivnosti tiolne grupe (kao posledice vezivanja masnih kiselina), uticati na njen potencijal kao hvatača reaktivnih karbonilnih vrsta, a time i na vrednosti sadržaja tiolne grupe koje se primenjuju kao markeri oksidativnog/karbonilnog stresa. Stoga je jedan od ciljeva ove teze bio ispitivanje uticaja vezivanja različitih masnih kiselina (zasićenih, mono- i polinezasićenih) na reaktivnost Cys34 tiolne grupe.

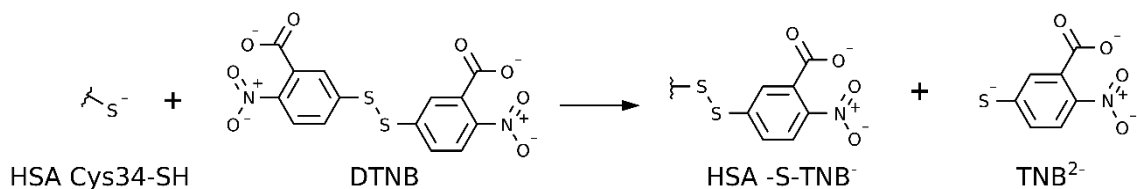
4.2.1. Uslovi praćenja promene reaktivnosti Cys34 tiolne grupe

Tok reakcije karbonilovanja HSA metil-glioksalom, praćen kao smanjenje molskog odnosa slobodnog tiola i HSA sa vremenom (Poglavlje 4.1.), ukazuje da je za karakterizaciju reaktivnosti Cys34-SH znatno pogodniji parametar praćenje kinetike reakcije tiolne grupe sa DTNB-om poznate koncentracije, jer se poređenjem kinetičkih parametara može izvesti empirijski dokaz u kojoj meri različite MK vezane za HSA menjaju reaktivnost tiolne grupe (kao posledice promene njene dostupnosti usled vezivanja MK za HSA).

Kinetička karakterizacija reakcije tiolne grupe i DTNB-a urađena je određivanjem vrednosti konstanti brzine reakcije pseudo-prvog reda. Kako je tiolna grupa komercijalnog HSA delimično oksidovana (Clerici, Colombo et al. 2014), a u cilju lakšeg i pouzdanijeg praćenja promena sadržaja tiolnih grupa tokom reakcije sa DTNB, HSA je prvo redukovano sa DTT-om (Poglavlje 3.3.13.1.) tako da je sadržaj tiolne grupe posle redukcije u proseku iznosio oko 80 %. Dakle, u svim *in vitro* eksperimentima početna koncentracija HSA je bila 0,5 mmol/L, a sadržaj HSA-SH oko 0,4 mmol/L .

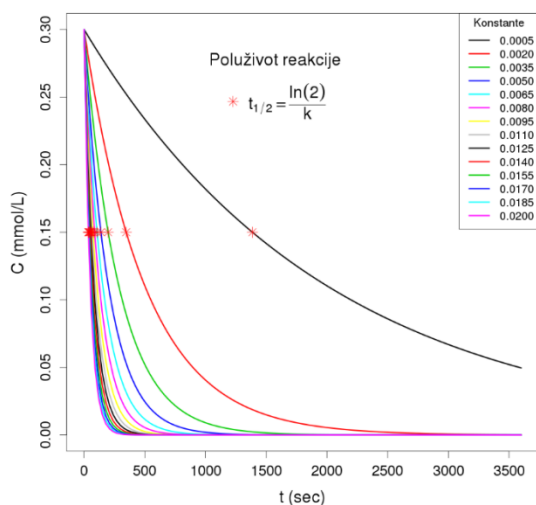
Koncentracija tiolne grupe na kraju reakcije sa metilglioksalom često je bila oko 0,1 mmol/L.

Reakcija tiolne grupe sa DTNB-om (Slika 18) može se svesti na reakciju pseudo-prvog reda ukoliko je koncentracija tiola znatno manja od koncentracije DTNB-a, jer tada brzina hemijske reakcije zavisi samo od koncentracije tiola, što je i eksperimentalno potvrđeno u preliminarnim eksperimentima praćenja promene koncentracije tiola u funkciji vremena. U kinetičkim eksperimentima korišćen je rastvor DTNB-a koncentracije 2,0 mmol/L, tako da je koncentracija DTNB-a u odnosu na koncentraciju tiolne grupe bila veća za 5 do 20 puta.



Slika 18 – Jednačina reakcije tiolne grupe sa DTNB-om

Za reakcije pseudo-prvog reda karakteristična je logaritamska zavisnost promene koncentracije reaktanta/proizvoda u vremenu (Slika 19). U reakciji sa Elmanovim reagensom spektrofotometrijski se prati koncentracija proizvoda reakcije, TNB²⁻ jona, merenjem apsorbanse na 412 nm. Usled stehiometrije, u kojoj je molski odnos tiola i nastalog TNB²⁻ 1 : 1, koncentracija tiola u bilo kom trenutku se može izračunati oduzimanjem koncentracije TNB²⁻ jona od finalne vrednosti koncentracije TNB²⁻ na kraju reakcije (u primenjenim eksperimentalnim uslovima reakcija traje do 30 minuta).



(a)

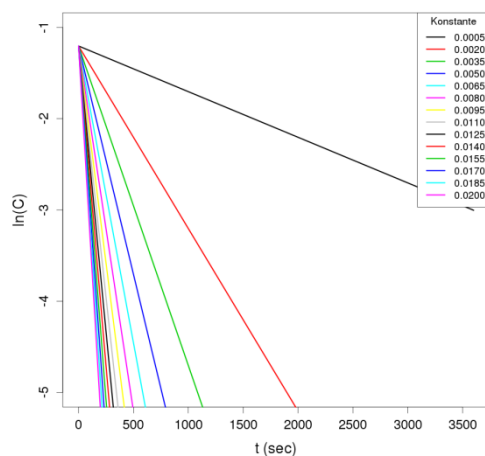
$$v = k \cdot [SH], \quad -\frac{d[SH]}{dt} = k \cdot [SH]$$

$$\frac{d[SH]}{[SH]} = -k dt, \quad \int_{[SH]_0}^{[SH]_t} \frac{d[SH]}{[SH]} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln[SH]_t - \ln[SH]_0 = -kt,$$

$$\ln[SH]_t = -kt + \ln[SH]_0$$

(b)



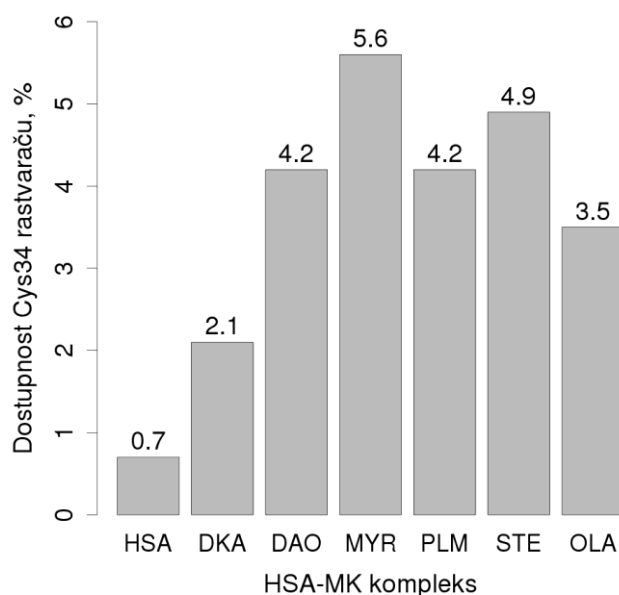
(c)

Slika 19 - Simulacija reakcije pseudo-prvog reda. Simulacija je izvedena u R –u sa parametrima $C_0 = 0,3 \text{ mmol/L}$, a vrednosti konstante brzine reakcije k su u opsegu $0,005 - 0,020 \text{ s}^{-1}$. Tačka (*), koja prikazuje poluživot reakcije, izvedena je iz jednačine primenom $C_t = \frac{1}{2} C_0$. Svojstvo reakcija prvog (i pseudo-prvog) reda je da poluživot reakcije ne zavisi od početne koncentracije reaktanta, već samo od kinetičke konstante k . (a) Promena koncentracije reaktanta u funkciji vremena. (b) Matematički opis reakcije pseudo-prvog reda. Iz poslednje jednačine se vidi da je moguća linearizacija kinetičkog grafik kao semi-log grafik $\ln(C) = f(t)$. (c) Linearizovani grafik. Početak svake prave je $\ln(C_0)$, a nagib prave je $-k$. Konstruisanjem grafik i linearizacijom eksperimentalnih parametara moguće je odrediti konstantu k .

4.2.2. Vezivanje masnih kiselina za HSA

HSA je primarni transporter MK u cirkulaciji, kao što je prikazano u poglavlju 2.5. Posедуje sedam (deset) vezujućih mesta različitog afiniteta za MK (Slika 6), te stoga u realnim uzorcima vezuje različite MK, u molarnom odnosu od 0,1 do 6:1. Veća zasićenost HSA masnim kiselinama se dešava pri intenzivnom vežbanju (Brodersen, Andersen et al. 1990) ili u patološkim stanjima kao što su dijabetes, bolesti jetre i kardiovaskularne bolesti (Bergman and Ader 2000, van der Vusse, van Bilsen et al. 2000).

Računski dobijene vrednosti, na osnovu kristalografskih podataka različitih HSA–MK kompleksa, za izloženost/dostupnost Cys34 ostatka prema rastvaraču pokazuju značajnu varijabilnost (od 2,1 do 5,6 %) u zavisnosti od tipa MK vezane za HSA (Tabela 2, C34 red; Slika 20). Dostupnost ostatka Cys u slučaju obezmašćenog HSA je 5-6 puta manja od dostupnosti u kompleksima HSA-MK.



Slika 20 - Dostupnost Cys34 ostatka rastvaraču izračunata programom ASAView za različite HSA-MK komplekse. HSA: albumin bez vezanih MK (PDB ID 1AO6); DKA: HSA sa vezanom kaprinskom kiselinom (DKA, C10:0, PDB ID 1E7E); DAO: HSA sa laurinskom kiselinom (DAO, C12:0, PDB ID 1E7F); MYR: HSA sa miristinskom kiselinom (MYR, C14:0, PDB ID 1E7G); PLM: HSA sa palmitinskom kiselinom

(PLM, C16:0, PDB ID 1E7H); STE: HSA sa stearinskom kiselinom (STE, C18:0, PDB ID 1E7I); OLA: HSA sa oleinskom kiselinom (OLA, C18:1n9, PDB ID 1GNI).

Promena dostupnosti Cys34 ostatka direktno utiče na reaktivnost Cys34-SH (Takabayashi, Imada et al. 1983, Gryzunov, Arroyo et al. 2003, Torres, Turell et al. 2012). Provera reaktivnosti tiolne grupe, pod uslovima opisanim u Poglavlju 3.3.5 pokazala je da je uticaj vezanih MK na reaktivnost Cys34-SH značajan.

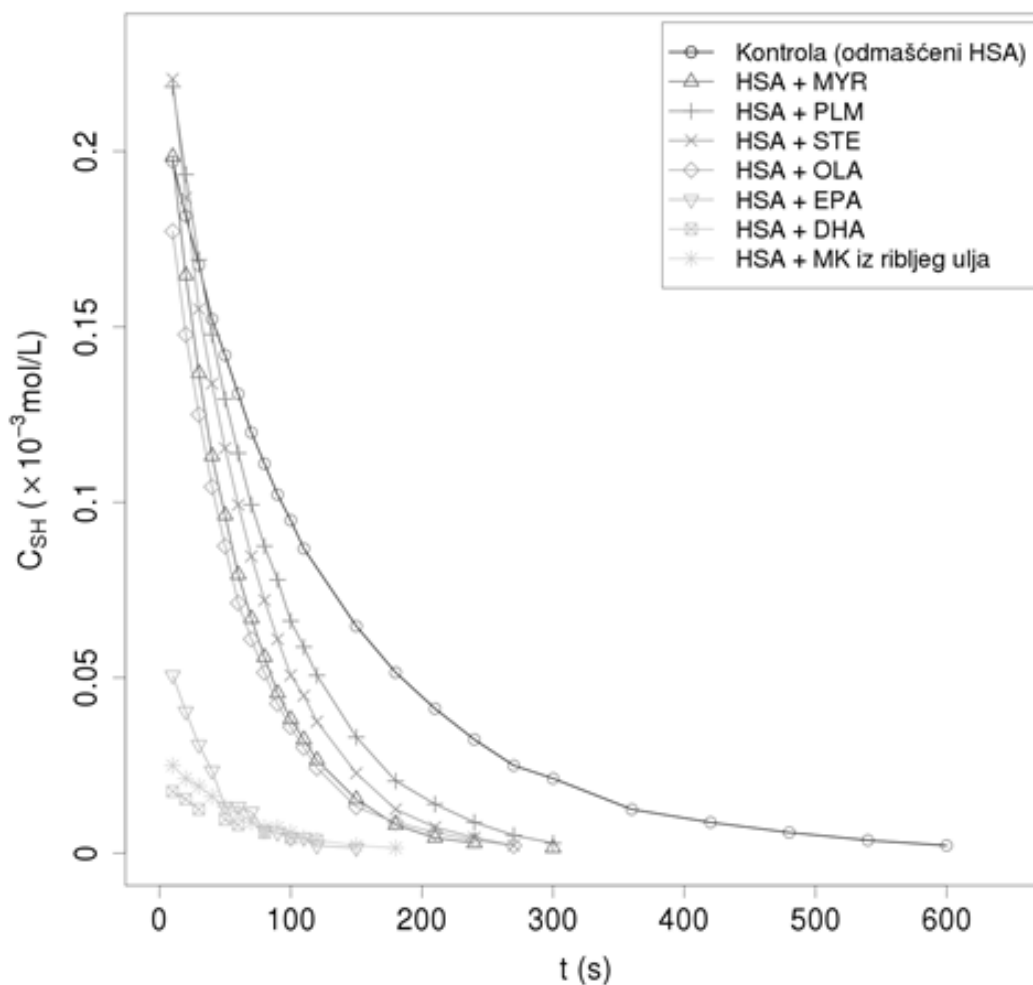
Eksperimenti vezivanja MK za HSA su dizajnirani tako da je HSA prvo odmašćen i redukovan, a potom inkubiran sa MK tako da se sva mesta visokog afiniteta zasite odgovarajućom MK. Na taj način HSA molekul poprima konformaciju najbližnju kristalografskim modelima, koji su korišćeni za izračunavanje dostupnosti ostatka Cys34, te je moguće uporediti trendove u povećanju dostupnosti u odnosu na reaktivnost Cys34-SH sa DTNB-om, pod uslovima reakcije pseudo-prvog reda.

U cilju dobijanja različitih HSA-MK kompleksa, inkubacija HSA je rađena sa masnim kiselinama različite dužine lanca i različite zasićenosti: miristinskom kiselinom (MYR, C14:0), palmitinskom kiselinom (PLM, C16:0), stearinskom kiselinom (STE, C18:0), oleinskom kiselinom (OLA, C18:1), preparatom ribljeg ulja iz koga su izolovane i prečišćene slobodne MK, eikozapentaenskom kiselinom (EPA, C20:5) i dokozahexaenskom kiselinom (DHA, C22:6). Pod uslovima inkubacije opisanim u Poglavlju 3.3.14, u proseku je četiri molekula MK vezano po molekulu HSA. Broj molova MK vezanih po molu HSA određen je kvantitativnom TLC tehnikom, koja je razvijena za ove potrebe i detaljno opisana kasnije u tekstu.

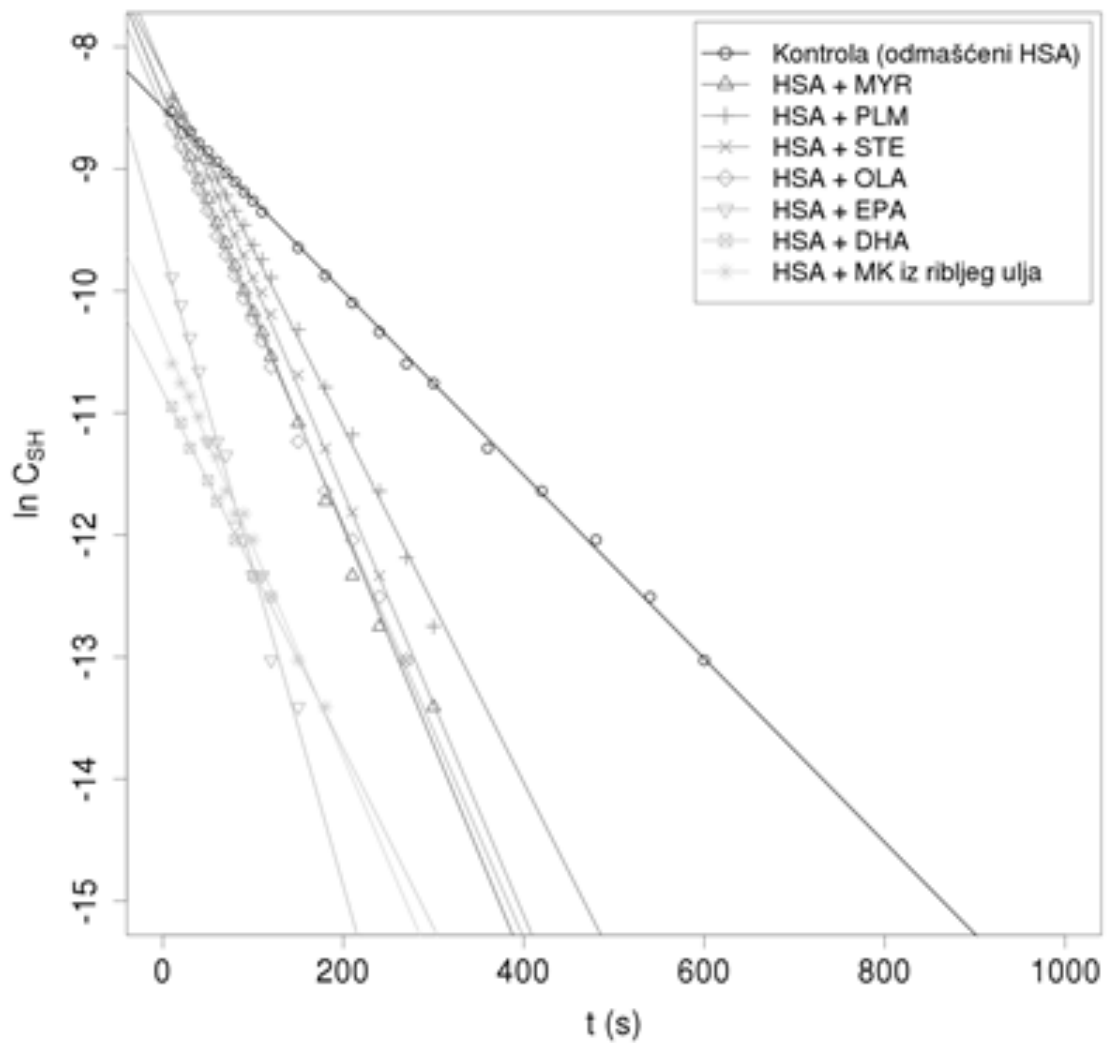
4.2.3. Određivanje konstanti brzine reakcije Cys34 tiolne grupe kompleksa HSA-MK sa DTNB-om

Tok reakcije tiolne grupe HSA-MK kompleksa i DTNB-a praćen je tokom 30 minuta. Reakcija se završavala za oko 10 minuta. Krive zavisnosti promene koncentracije sadržaja tiolne grupe sa vremenom prikazane su na slici 21. Usled velike reaktivnosti Cys34-SH u HSA-MK kompleksima sa polinezasićenim masnim kiselinama iz ribljeg

ulja, kao i čistim EPA i DHA, koncentracije slobodnog tiola već na početku inkubacije sa DTNB su bile dosta niske, što pokazuje koliko je karakterizacija reaktivnosti tiolne grupe određivanjem konstante brzine reakcije k superiornija od praćenja reakcionog toka. Linearizacijom podataka, prema opisanoj metodologiji za reakciju pseudo-prvog reda ($\ln C = -kt + \ln C_0$), dobijene su prave (Slika 22). Koeficijent korelacije za sve prave bio je veći od 0,99 (Tabela 4).



Slika 21 - Kinetički tok reakcije Cys34-SH sa DTNB-om iz različitih HSA preparata. MYR-miristinska kiselina, PLM-palmitinska kiselina, STE-stearinska kiselina, OLA-oleinska kiselina, EPA-eikozapentenska kiselina, DHA-dokozaheksaenska kiselina



Slika 22 - Linearizacija kinetika konstruisanjem semilogaritamskog grafika $\ln C = f(t)$. MYR-miristinska kiselina, PLM-palmitinska kiselina, STE-stearinska kiselina, OLA-oleinska kiselina, EPA-eikozapentenska kiselina, DHA-dokozaheksaenska kiselina

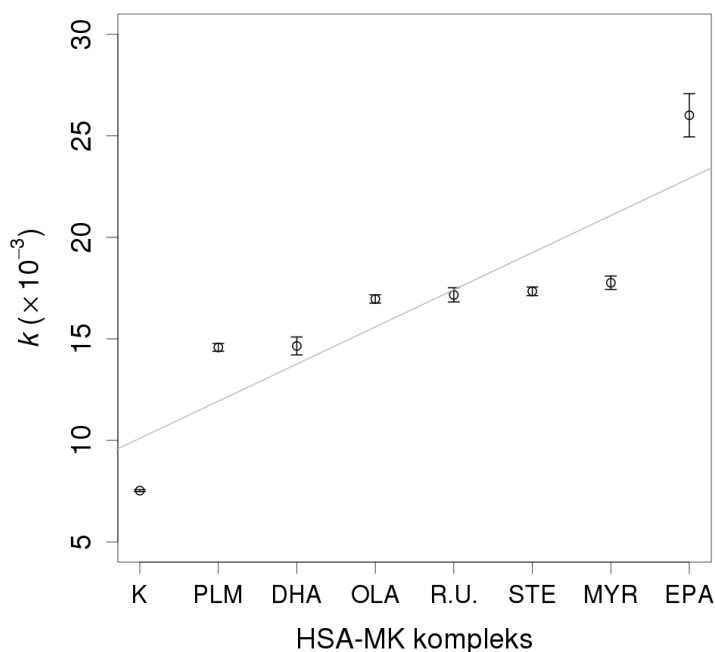
Tabela 4 – Jednačine pravih, dobijenih linearizacijom kinetičkih podataka, prikazanih na Slici 22 i vrednosti koeficijenata korelacije

HSA preparat	Jednačina prave $y = a + bx$	Koeficijent korelacije
Kontrola (odmašćeni HSA)	$a = -8,500 \pm 0,012$ $b = -7,524 \cdot 10^{-3} \pm 0,045 \cdot 10^{-3}$	0,999
HSA + MYR	$a = -8,389 \pm 0,045$ $b = -17,766 \cdot 10^{-3} \pm 0,33 \cdot 10^{-3}$	0,995
HSA + PLM	$a = -8,200 \pm 0,028$ $b = -14,581 \cdot 10^{-3} \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	0,997
HSA + STE	$a = -8,183 \pm 0,028$ $b = -17,344 \cdot 10^{-3} \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$	0,998
HSA + OLA	$a = -8,519 \pm 0,027$ $b = -16,966 \cdot 10^{-3} \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	0,998
HSA + EPA	$a = -9,673 \pm 0,087$ $b = -26,016 \cdot 10^{-3} \pm 1,06 \cdot 10^{-3}$	0,980
HSA + DHA	$a = -10,820 \pm 0,031$ $b = -14,650 \cdot 10^{-3} \pm 0,44 \cdot 10^{-3}$	0,994
HSA + MK izolovane iz ribljeg ulja	$a = -10,390 \pm 0,032$ $b = -17,170 \cdot 10^{-3} \pm 0,35 \cdot 10^{-3}$	0,995

* MYR-miristinska kiselina, PLM-palmitinska kiselina, STE-stearinska kiselina, OLA-oleinska kiselina, EPA-eikozapentaenska kiselina, DHA-dokozaheksaenska kiselina

Dobijene vrednosti kinetičkih konstanti za tiolnu grupu svih HSA-MK kompleksa su bile u opsegu od $14,58 \pm 0,19 \times 10^{-3}$ do $26,02 \pm 1,06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 5), što pokazuje da vezivanje svih ispitivanih MK za HSA dovodi do povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe za 2 do 3,5 puta (k vrednost za HSA: $7,52 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Od ispitivanih zasićenih MK najjači efekat na reaktivnost tiolne grupe ispoljila je miristinska kiselina ($k=17,77 \pm 0,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), tj. MK sa najmanjom dužinom lanca. Stearinska i oleinska kiselina ispoljile su slične efekte na reaktivnost HSA-SH (k vrednosti iznose $17,34 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ i $16,97 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom). Najveći uticaj na reaktivnost HSA-SH grupe postignut je posle vezivanja polinezasićene eikozapentaenske kiseline ($k=26,02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Kada se

konstante brzine reakcije sortiraju prema porastu njihovih vrednosti (Slika 23) i koreliraju, dobija se vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije od 0,881, što pokazuje da vrednosti k nisu slučajne, već da postoji izvesna pravilnost. Na osnovu ovih rezultata, kao i rezultata Toresa i saradnika (Torres, Turell et al. 2012), dobijenih pri ispitivanju reaktivnosti tiolne grupe HSA-PLM kompleksa sa DTNB-om, može se zaključiti da vezivanje MK za HSA ima za posledicu povećanje reaktivnosti Cys34 tiolne grupe i da povećanje zavisi od tipa MK, odnosno od dužine lanca i nezasićenosti MK.



Slika 23 - Linearni model kinetičkih konstanti za regresionu analizu (C- odmašćeni HSA; PLM- kompleks HSA-palmitinska kiselina; DHA- kompleks HSA-dokozaheksaenska kiselina; OLA- kompleks HSA-oleinska kiselina; FO- kompleks HSA-Mk izolovane iz ribljeg ulja; STE: kompleks HSA- stearinska kiselina; MYR- kompleks HSA- miristinska kiselina; EPA: kompleks HSA-eikozapentenska kiselina.

Tabela 5 – Konstante brzine reakcije (pseudo prvog reda) Cys34 tiolne grupe (i DTNB) kompleksa HSA sa različitim MK

Kompleks HSA-MK	k ×10⁻³ s⁻¹
Kontrola (odmašćeni HSA)	7,52 ± 0,04
HSA-MYR	17,77 ± 0,33
HSA-PLM	14,58 ± 0,19
HSA-STE	17,34 ± 0,21
HSA-OLA	16,97 ± 0,20
HSA-EPA	26,02 ± 1,06
HSA-DHA	14,65 ± 0,44
HSA-MK izolovane iz ribljeg ulja	17,17 ± 0,35

* MYR-miristinska kiselina, PLM-palmitinska kiselina, STE-stearinska kiselina, OLA-oleinska kiselina, EPA-eikozapentenska kiselina, DHA-dokozaheksaenska kiselina

4.2.3.1. Uticaj vezivanja masnih kiselina ribljeg ulja za HSA na reaktivnost tiolne grupe ostatka Cys34

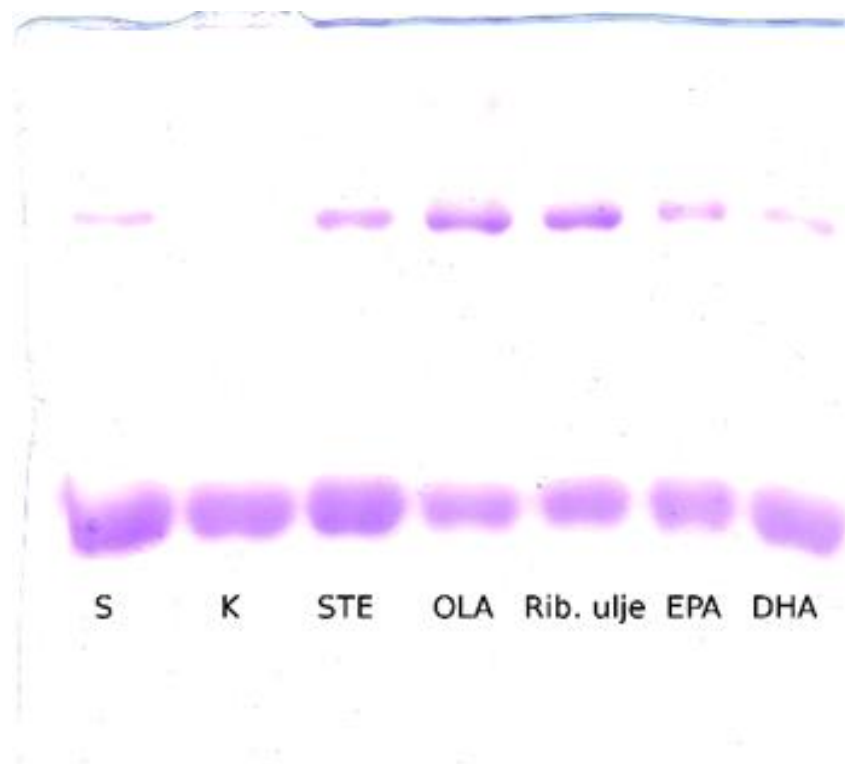
Dobijeni rezultati o uticaju vezivanja različitih MK na promenu reaktivnosti Cys34 tiolne grupe otvaraju mogućnosti modulacije reaktivnosti, odnosno modulacije tiolnog kapaciteta HSA unošenjem određenih MK kao suplemenata ishrani. Takvi promenjeni režimi ishrane mogli bi imati značajne implikacije u patološkim stanjima gde je nivo oksidativnog i karbonilnog stresa izuzetno visok, poput dijabetesa kardiovaskularnih bolesti i bolesti jetre, takođe i stanja u kojima je nivo slobodnih MK u cirkulaciji povišen. Brojne studije (Farmer, Montori et al. 2001, Weitz, Weintraub et al. 2010, Mohebi-Nejad and Bikdeli 2014, Han, Yun et al. 2016) koje su se bavile upotrebom ribljeg ulja, koje sadrži nezasićene omega-3 masne kiseline DHA i EPA, kao suplementa raznovrsnoj ishrani u patofiziološkim stanjima (posebno kod bolesti

kardiovaskularnog i nervnog sistema) potvrđuju pozitivne efekte ovog suplementa u smislu poboljšanja kako fizioloških tako i metaboličkih parametara. Cilj ove teze je stoga bio da se ispita uticaj vezivanja MK ribljeg ulja na reaktivnost tiolne grupe albumina, odnosno sagledavanje mogućnosti modulacije svojstava HSA kao hvatača reaktivnih dikarbonila pomoću ovog suplementa.

Vrednost konstante brzine reakcije Cys34 tiolne grupe kompleksa HSA-masne kiseline ribljeg ulja ($17,17 \pm 0,35 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, Tabela 5) je 2,4 puta veća od vrednosti dobijene za SH grupu odmašćenog HSA, i nalazi se između vrednosti dobijenih za tiolne grupe kompleksa HSA-OLA i HSA-DHA (Slika 23). Velika razlika u kinetičkim konstantama za eikozapentaensku kiselinu i dokozaheksaensku kiselinu ($26,02$ naspram $14,65 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), dominantne sastojke ribljeg ulja, ukazuje na različiti doprinos ovih polinezasićenih MK reaktivnosti tiolne grupe HSA. Uzimajući u obzir da kapsule ribljeg ulja, korišćene u eksperimentalnom radu, sadrže 37 % eikozapentaenske, 31,9 % dokozaheksaenske i 8 % oleinske kiseline (sastav određen na osnovu GC-MS spektra), kao i vrednosti kinetičkih konstanti kompleksa HSA sa ovim MK, i pretpostavljajući da je doprinos prosečnoj vrednosti kinetičke konstante aditivan, izračunata je vrednost kinetičke konstante za tiolnu grupu kompleksa HSA-MK ribljeg ulja ($16,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Izračunata vrednost konstante brzine reakcije se dobro slaže sa eksperimentalno određenom vrednošću ($17,17 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Povećana reaktivnost tiolne grupe kompleksa HSA-masne kiseline ribljeg ulja može da doprinese bržem uklanjanju reaktivnih vrsta, njihovim vezivanjem za tiolnu grupu HSA, i time onemogućavanju daljih oštećenja ćelija i tkiva koja prate oksidativni i karbonilni stres. Sa druge strane, povećana aktivnost sa sobom povlači i brže smanjenje tiolnog kapaciteta plazme usled smanjenja sadržaja slobodne tiolne grupe HSA. Time bi se u patofiziološkim stanjima sa hronično povišenim nivoom reaktivnih kiseoničnih i karbonilnih vrsta onemogućavalo održavanje tiolnog kapaciteta plazme. Naravno, prisustvo drugih antioksidativnih vrsta i malih tiola, koji se brzo regenerišu u plazmi, u mnogome menja sliku promena na samom molekulu HSA tokom suplementacije ribljim uljem.

4.2.4. Šta je uzrok promene reaktivnosti Cys34 tiolne grupe u kompleksima HSA-MK?

Kristalografske analize HSA-MK kompleksa su pokazale da se mesta vezivanja MK dugih lanaca na HSA preklapaju. Međutim, detaljnijom analizom utvrđeno je da se interakcije između HSA i MK razlikuju (Bhattacharya, Grune et al. 2000), odnosno da se mesta vezivanja razlikuju prema afinitetu za različite MK (zasićeni, mono ili polinezasićene) (Petitpas, Grune et al. 2001). Stoga različiti efekti, koje pri vezivanju ispoljavaju različite MK na dostupnost/reaktivnost tiolne grupe, mogu da budu posledica razlika u geometrijama njihovih molekula, odnosno različitih promena tercijarne strukture HSA pri vezivanju. Promene u svojstvima HSA nakon vezivanja MK praćene su nativnom PAG elektroforezom i upotrebom fluorescentne spektroskopije. Kompleksi MK-HSA pokazivali su istu elektroforetsku pokretljivost kao standard i odmašćeni HSA (kontrola) (Slika 24). Iako MK-vezujuća mesta nisu identična, svako mesto je sačinjeno od hidrofobnog džepa koji interaguje sa ugljovodoničnim nizom, a kod pet vezivnih mesta MK je poklopljena sa jedne strane džepa gde ostaci uglavnom polarnih aminokiselina interaguju sa karboksilatnim jonom MK. Dodatno, dimerska traka HSA nije vidljiva kod odmašćenog HSA, dok su kod kompleksa MK-HSA (naročito kod OLA, MK iz ribljeg ulja, EPA i DHA) dimerne trake intenzivne (sa zastupljenostima 35,4 %, 33,8 %, 20,1 % i 11,9 %, respektivno), a mogu se uočiti i trake oligomera kod nekih kompleksa. Značajno smanjivanje početnog sadržaja slobodne tiolne grupe kod MK-HSA kompleksa sa nezasićenim MK (Tabela 3), može se objasniti nastajanjem dimera i oligomera putem S-S mostova i visokom reaktivnošću/dostupnošću slobodne tiolne grupe HSA kod pomenutih kompleksa.

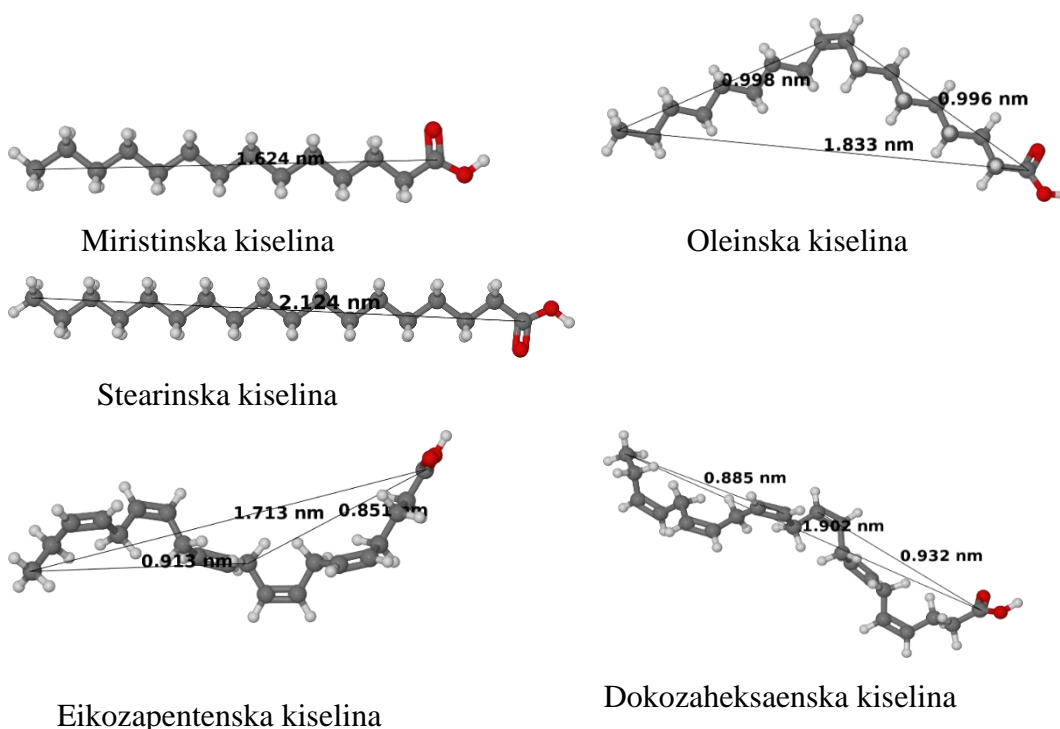


Slika 24 - Nativna PAG elektroforeza (9,5 % gel) HSA-MK kompleksa. Po traci je nanošeno 7 μg proteina koji su obojeni CBB-om. S: standard, komercijalni HSA; K: kontrola, odmašćeni HSA; STE: kompleks HSA-stearinska kiselina; OLA: kompleks HSA-oleinska kiselina; Rib. ulje: kompleks HSA-masne kiseline izolovane iz ribljeg ulja; EPA: kompleks HSA-eikozapentenska kiselina; DHA: kompleks HSA-dokozaheksenska kiselina.

Detaljnijom analizom povezanosti tipa MK (vezane za HSA) sa reaktivnošću tiolne grupe uočava se da ne postoji jednostavno objašnjenje da dužina C-niza ili pak geometrija molekula MK direktno utiču na izloženost Cys34-SH i time na promenu njene reaktivnosti. Međutim, uzimajući u obzir dostupne kristalografske podatke pri visokoj rezoluciji za sedam dobro definisanih mesta vezivanja MK na molekulu HSA, uočava se da se MK kraćeg lanca mnogo bolje uklapaju u šupljine vezivnih mesta 6 i 7, kao i mesta 2. Dakle, viša vrednost konstante brzine reakcije HSA-MYR kompleksa ($k=17,77\pm 0,33\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), u odnosu na HSA-PLM ($k= 14,58 \pm 0,19\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), je najverovatnije posledica izuzetne komplementarnosti molekula miristinske kiseline sa vezivnim mestima na molekulu HSA, koja najviše utiču na izloženost Cys34 tiolne

grupe rastvaraču. Vrednosti izloženosti/dostupnosti Cys34 tiolne grupe rastvaraču, dobijene računski primenom programa ASAView na osnovu kristalografskih podataka za različite HSA-MK komplekse, koreliraju u velikom stepenu ($r=0,927$) sa vrednostima konstanti brzine reakcije, što ukazuje na direktnu vezu između promene strukture molekula HSA vezivanjem MK i dostupnosti, odn. reaktivnosti tiolne grupe ostatka Cys34. Dostupnost tiolne grupe u HSA-MYR kompleksu (5,6 %) je viša od dostupnosti u HSA-PLM kompleksu (4,2%), pa je stoga je i konstanta brzine reakcije tiolne grupe veća.

Kada su u pitanju polinezasićene kiseline EPA i DHA, objašnjenje je znatno kompleksnije. Postoji velika verovatnoća da se pomenute MK usled veoma uvijene sve-cis-strukture (Slika 25), u odnosu na metilensku strukturu zasićenih MK i blagu uvijenost mononezasićene oleinske kiseline, vezuju i za neka druga vezivna mesta na molekulu HSA koja nisu mesta vezivanja MK već su karakterističnija za steroide i polifenole. Kao posledica toga na potpuno drugačiji način dovode do strukturnih promena molekula HSA i promena u reaktivnosti Cys34-SH.

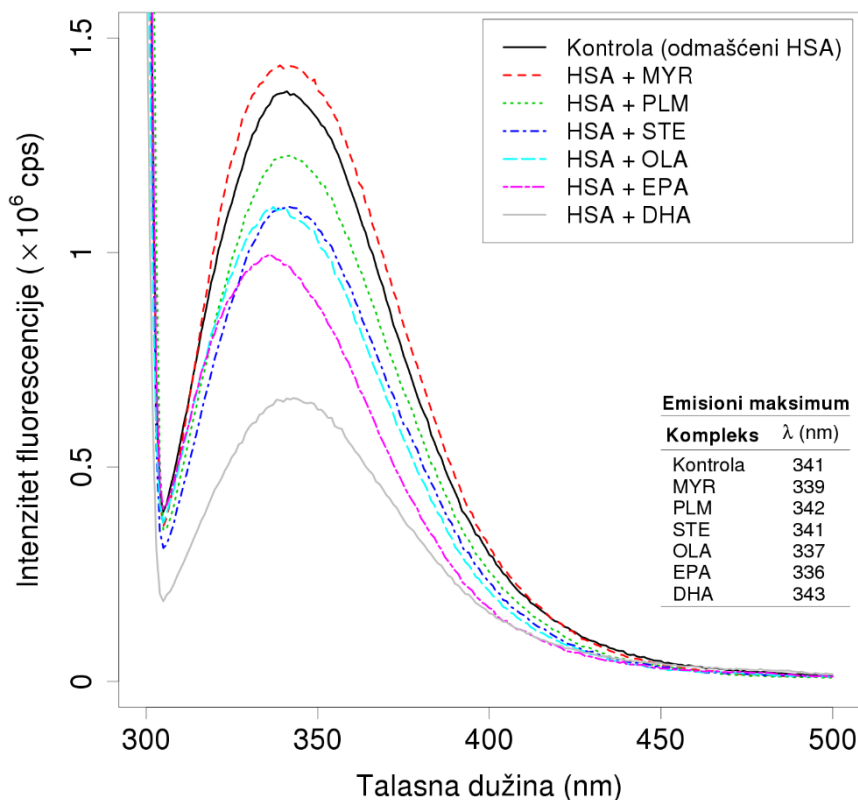


Slika 25 - Modeli molekula masnih kiselina sa prikazanim udaljenostima segmenata koji potencijalno mogu linearno zauzeti vezivna mesta na molekulu HSA. Prikaz je načinjen programom Jmol v14.14.1.

Uticaj vezivanja različitih masnih kiselina na promenu konformacije HSA (a time i dokazane reaktivnosti tiolne grupe) ispitan je spektrofluorimetrijski, snimanjem fluorescentnog spektra komercijalnog HSA, koji je prethodno odmašćen (kontrola) i fluorescentnih spektara kompleksa HSA-MK. Kompleksi HSA-MK su svedeni na jednaku koncentraciju od 0,5 $\mu\text{mol/L}$ i snimljeni su emisioni spektri (Slika 26) nakon ekscitacije na 295 nm, što se smatra talasnom dužinom pogodnom za ispitivanje promene fluorescencije ostatka triptofana Trp214, jedinog u molekulu HSA (Moriyama, Ohta et al. 1996). Programom ASAView ispitana je i relativna izloženost Trp214 rastvaraču (Tabela 6), kao mogući parametar za poređenje kristalografskih struktura i eksperimentalno dobijenih podataka: promene emisionog maksimuma i intenziteta maksimuma.

Tabela 6 – ASAView proračun za izloženost (%) triptofan-214 (W214) ostatka. HSA: albumin bez vezanih MK (PDB ID 1AO6); DKA: HSA sa vezanom kaprinskom kiselinom (DKA, C10:0, PDB ID 1E7E); DAO: HSA sa laurinskom kiselinom (DAO, C12:0, PDB ID 1E7F); MYR: HSA sa miristinskom kiselinom (MYR, C14:0, PDB ID 1E7G); PLM: HSA sa palmitinskom kiselinom (PLM, C16:0, PDB ID 1E7H); STE: HSA sa stearinskom kiselinom (STE, C18:0, PDB ID 1E7I); OLA: HSA sa oleinskom kiselinom (OLA, C18:1n9, PDB ID 1GNI)

AK	HSA	DKA	DAO	MYR	PLM	STE	OLA
W214	25,8	22,5	24,5	25,8	27	29,9	32

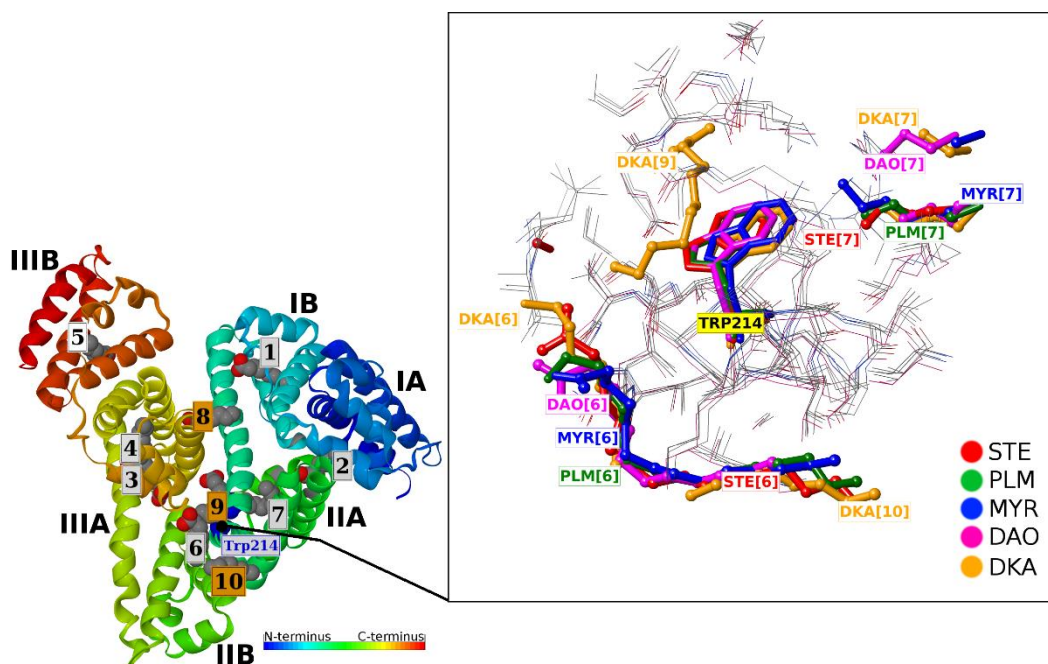


Slika 26 - Emisioni spektri HSA-MK kompleksa nakon ekscitacije na 295 nm. Kontrola: odmašćeni HSA; MYR: kompleks HSA- miristinska kiselina; PLM: kompleks HSA-palmitinska kiselina; STE: kompleks HSA-stearinska kiselina; OLA: kompleks HSA-oleinska kiselina; EPA: kompleks HSA- eikozapentenska kiselina; DHA: kompleks HSA-dokozaheksaenska kiselina

Promene položaja i intenziteta emisionog maksimuma evidentne su i jedinstvene za svaki HSA-MK kompleks. U odnosu na intenzitet fluorescencije kontrole (100 %), osim HSA-MYR (104,4 %), intenzitet fluorescencije na maksimumu smanjuje se za sve ispitivane komplekse HSA i MK (PLM – 89,1 %, STE – 80,5 %, OLA – 80,4 %, EPA – 72,4 %, DHA – 48,0 %). Dodatno, vezivanje nezasićenih MK za HSA dovodi do pomeranja maksimuma emisije u levo.

Intenzitet fluorescencije zavisi od okoline Trp214, ali i od apsolutne orijentacije bočnog ostatka Trp214. Bliži uvid u neposrednu okolinu Trp214 ostatka otkriva da se u

okruženju od 10 Å (Slika 27) nalaze vezivna mesta 6 i 7 (IIA subdomen), kao i manje specifična vezivna mesta 9 i 10 za MK kraćeg niza. Takođe, Trp214 je lociran na prelazu između IIA i IIIA subdomena i učestvoju u hidrofobnom slaganju domena. To ukazuje da vezivanje MK za HSA izaziva promene u mikrookolini Trp i dovodi do zaklanjanja ili otkrivanja Trp214 (u Tabeli 6 uočava se porast izloženosti Trp u kompleksima HSA sa PLM, STE i OLA), što se direktno odražava na intenzitet fluorescencije (Slika 26). Dakle, može se zaključiti da vezivanje MK za HSA dovodi do promene konformacije molekula HSA, a stepen promene određen je tipom i brojem molekula MK vezanih za HSA, što je u skladu za zaključcima do kojih su došli Curry i saradnici (Curry, Brick et al. 1999).



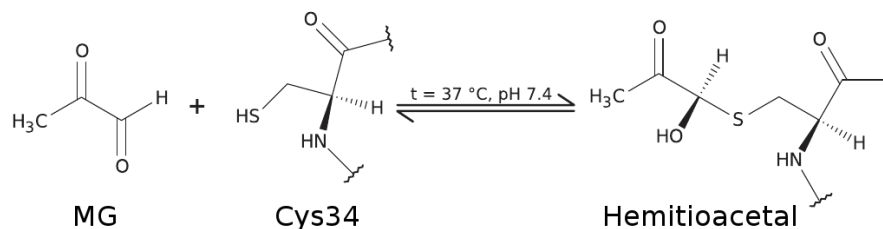
Slika 27 - Neposredna okolina (10 Å) Trp214 ostatka. Preklapljeni modeli na osnovu kristalografskih podataka za strukture: PDB ID 1E7I, STE – stearinska kiselina; PDB ID 1E7H, PLM - palmitinska kiselina; PDB ID 1E7G, MYR – miristinska kiselina; PDB ID 1E7F, DAO – laurinska kiselina; PDB ID 1E7E, DKA – kapronska kiselina. Prikaz je načinjen programom Jmol v14.14.1.

4.3. Uticaj vezivanja masnih kiselina na karbonilaciju HSA-SH grupe metilgliksalom *in vitro*

α -oksoaldehidi reaguju sa amino- i guanidino-grupama lizina i arginina, i dovode do stvaranja AGE, ali i sa tiolnom grupom Cys34. Posledica ovih reakcija je promena tercijarne strukture proteina, odnosno njihove aktivnosti i funkcije. Dodatno, proizvodi reakcije α -oksoaldehida i grupa na površini molekula proteina mogu reagovati sa amino- ili tiolnom grupom drugog molekula proteina i doprineti umrežavanju proteina (razvoju mikro- i makro-vaskularnih komplikacija).

Zaključci prikazani u prethodnom poglavlju, da reaktivnost Cys34 tiolne grupe zavisi od tipa MK vezane za HSA, imaju važnu implikaciju o mogućnosti modulacije reaktivnosti tiolne grupe (antioksidativne i kao hvatača) primenom suplemenata. Ovo, takođe, ima značaj u patološkim stanjima u kojima je istovremeno povećan sadržaj slobodnih MK u cirkulaciji, kao i reaktivnih karbonilnih i kiseoničnih vrsta (Cistola and Small 1991). Stoga je jedan od ciljeva teze bio da se ispita uticaj vezivanja masnih kiselina (različite dužine lanca, zasićenih, mono- i polinezasićenih) na potencijal tiolne grupe ostatka Cys34 kao hvatača α -oksoaldehida, u *in vitro* uslovima karbonilacije. Metilgliksal je izabran zbog njegove velike reaktivnosti, stvaranja u značajnim količinama (u Maillard-ovim reakcijama i lipidnoj peroksidaciji, pri spontanom razlaganju gliceraldehid-3-fosfata i dihidroksiaceton-fosfata, autooksidacijom ugljenih hidrata i degradaciji glukoze) u dijabetesu, oksidativnom stresu, uremiji, procesima starenja i inflamaciji. Polazna pretpostavka bila je da povećanje reaktivnosti tiolne grupe vezivanjem MK povećava i stepen modifikovanja metilgliksalom, što kao posledicu može da ima različite implikacija. U kratkom intervalu implikacija može biti pozitivna, jer se metilgliksal kao opasna molekulska vrsta brže atenuira, čime bi se smanjila mogućnost da dovede do ozbiljnih oštećenja i ćelijske smrti u osetljivim tkivima poput nerava. Na duge staze, ipak progresivno modifikovanje HSA smanjuje antioksidativni kapacitet HSA, ali i sposobnost HSA da transportuje ligande. U normalnim fiziološkim uslovima zdravog organizma dnevno nastane oko 120 μ mol metilgliksala što je oko 0,1 do 0,4 % glikolitičkog fluksa (Phillips and Thornalley 1993), ali u dijabetesu nastaje 5 – 6 puta više metilgliksala (Lapolla, Flamini et al. 2003). Na fiziološkom nivou metilgliksal menja anaboličke puteve ćelija vaskularnih i bubrežnih tkiva uzrokujući

time razvoj karakterističnih oštećenja tih tkiva (Goldin, Beckman et al. 2006). U modelu dijabetičnog miša, metilglioksal se pokazao kao dobar marker u praćenju ukupnih AGE proizvoda koji imaju implikacije na zdravlje (Maher, Dargusch et al. 2011). U *in vitro* studijama modifikovanja HSA metilglioksalom dokazano je modifikovanje ostataka lizina, arginina, Cys34 tiolne grupe, kao i agregacija proteinskih molekula (eng. crosslinking) koji vode ka stvaranju agregata velike molekulske mase (Acimovic, Stanimirovic et al. 2010). Smanjeni sadržaj HSA-SH u dijabetesu može se objasniti i povećanjem koncentracije metilglioksala i drugih α -oksoaldehida, kao i kiseoničnih vrsta u cirkulaciji (Faure, Troncy et al. 2005, Jovanovic, Pavicevic et al. 2014), ali iz utvrđenih činjenica da MK povećavaju reaktivnost HSA-SH ne treba isključiti ni povećani nivo MK u cirkulaciji tokom dijabetesa kao faktor koji utiče na smanjenje HA-SH u cirkulaciji. Reakcija metilglioksala sa slobodnim tiolom Cys34 ostatka prikazana je na Slici 28.



Slika 28 - Reakcija metilglioksala sa Cys34-SH ostatkom molekula HSA

4.3.1. Stepen karbonilacije HSA-SH grupe metilglioksalom *in vitro*

Rastvori HSA (0,5 mmol/L), odmašćenog (kontrola) i u kompleksima sa različitim masnim kiselinama, inkubirani su sa 100 mmol/L metilglioksalom u fosfatnom puferu (pH 7,4, 0,1 mol/L) tokom 30 minuta na 37 °C, a potom je određen sadržaj tiolne grupe DTNB-om (Tabela 7). Kada su zasićene MK vezane za HSA, vrednosti dobijene za sadržaj tiolne grupe u HSA-MK kompleksima su od 7 do 14 % veće nego u odmašćenom kontrolnom uzorku, što je povezano sa većom izloženošću/dostupnošću Cys34-SH grupe DTNB reagensu. Nakon inkubacije sa metilglioksalom oko 45 % tiolne grupe odmašćenog HSA je izreagovalo, dok je kod HSA kompleksa sa zasićenim

MKstepen modifikacije tiolne grupe bio značajno veći (od 53 do 65 %). Sličan procenat izreagovanih tiolnih grupa (od oko 60 %), dobijen je pri vezivanju mononezasićene oleinske kiseline za HSA. Međutim, kada su za HSA vezane polinezasićene MK dugog niza, eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina, kao i smeša pomenutih kiselina izolovana iz ribljeg ulja, dolazi do brzog i značajnog smanjenja sadržaja HSA-SH (0,126, 0,040, 0,062 mol SH/mol HSA, redom) u poređenju sa odmašćenim HSA (0,451 mol SH/mol HSA), tako da nije bilo moguće odrediti stepen njene modifikacije sa metilglioksalom.

Dakle, povećan stepen karbonilacije tiolne grupe metilglioksalom, dobijen posle vezivanja MK, ukazuje da masne kiseline utiču na kapacitet HSA-SH grupe kao hvatača metilglioksala, i da kapacitet zavisi od vrste masne kiseline vezane za HSA.

Tabela 7 – Stepem karbonilacije tiolne grupe, u HSA-MK kompleksima, metilglioksalom. Svako određivanje je rađeno u triplikatu.

HSA-MK kompleks	Sadržaj tiolne grupe*		Udeo izreagovane tiolne grupe, %
	(mmol SH / mmol HSA)		
	Bez metilglioksala	Sa metilglioksalom	
Kontrola (odmašćeni HSA)	0,451 ± 0,037	0,249 ± 0,022	44,8
HSA-MYR	0,483 ± 0,022	0,170 ± 0,028	64,8
HSA-PLM	0,515 ± 0,039	0,209 ± 0,031	59,4
HSA-STE	0,492 ± 0,018	0,233 ± 0,036	52,6
HSA-OLA	0,426 ± 0,031	0,172 ± 0,032	59,6

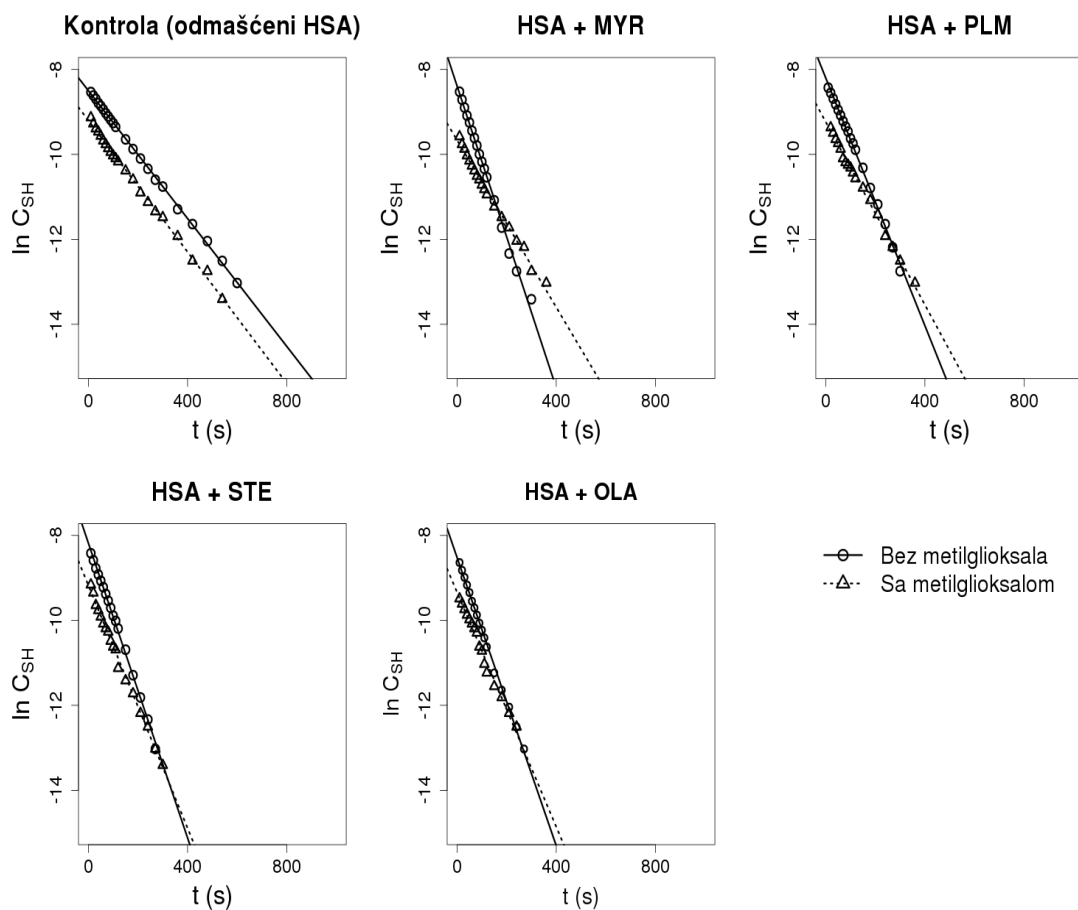
* Sadržaj tiolne grupe je određen sa DTNB, pre i posle reakcije sa metilglioksalom

** MYR-miristinska kiselina, PLM-palmitinska kiselina, STE-stearinska kiselina, OLA-oleinska kiselina.

4.3.2. Uticaj vezivanja masnih kiselina na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA karbonilovanog metilglioksalom

Proteini plazme, sa dugačkim poluživotom, podložniji su modifikaciji u uslovima karbonilnog stresa, koji se javlja u hiperglikemiji/dijabetesu. Kako je poluživot albumina oko 19 dana, on podleže reakciji glikacije. Sadržaj glikovanog HSA u dijabetesu je veći od 10 %, te se pored HbA_{1c} (glikovanog hemoglobina) primenjuje kao pouzdan marker hiperglikemije (Rondeau and Bourdon 2011). Glikovani HSA može dalje da se modifikuje kroz seriju reakcija i premeštanja, jer se u njima stvaraju α -oksoaldehidi (glioksal, metilglioksal i 3-deoksiglukozon). Reaktivna dikarbonilna jedinjenja mogu da modifikuju i guanidino- i amino-grupe u blizini tiolne grupe ostatka Cys34, da dovode do dodatne promene konformacije HSA, odnosno do promene dostupnosti i kinetike reakcije. Iz svega navedenog proističe pitanje: Kako se reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA menja u složenom sistemu, u kome je vezivanje slobodnih MK za HSA povećano i u kome je stepen karbonilacije molekula HSA povećan (kao što je slučaj u dijabetesu)? Stoga je ispitan uticaj vezanih masnih kiselina u kompleksima HSA-MK, koji su *in vitro* modifikovani metilglioksalom (MG-HSA-MK), na kinetiku reakcije tiolne grupe sa DTNB-om. Kako su tiolne grupe HSA-DHA, HSA-EPA i kompleksa HSA-MK riblje ulje, veoma osetljive na reakciju karbonilacije metilglioksalom, pad njihovog sadržaja je bio veoma brz. Stoga kinetike reakcija tiolnih grupa ovih kompleksa i DTNB-a nisu se mogle ispitivati.

Linearizovane reakcione kinetike tiolne grupe odmašćenog HSA i HSA-MK kompleksa, nemodifikovanih i modifikovanih metilglioksalom (MG-HSA i MG-HSA-MK), i DTNB-a prikazane su na Slici 29. Vrednosti konstanti brzine reakcije pseudo prvog reda date su u Tabeli 8).

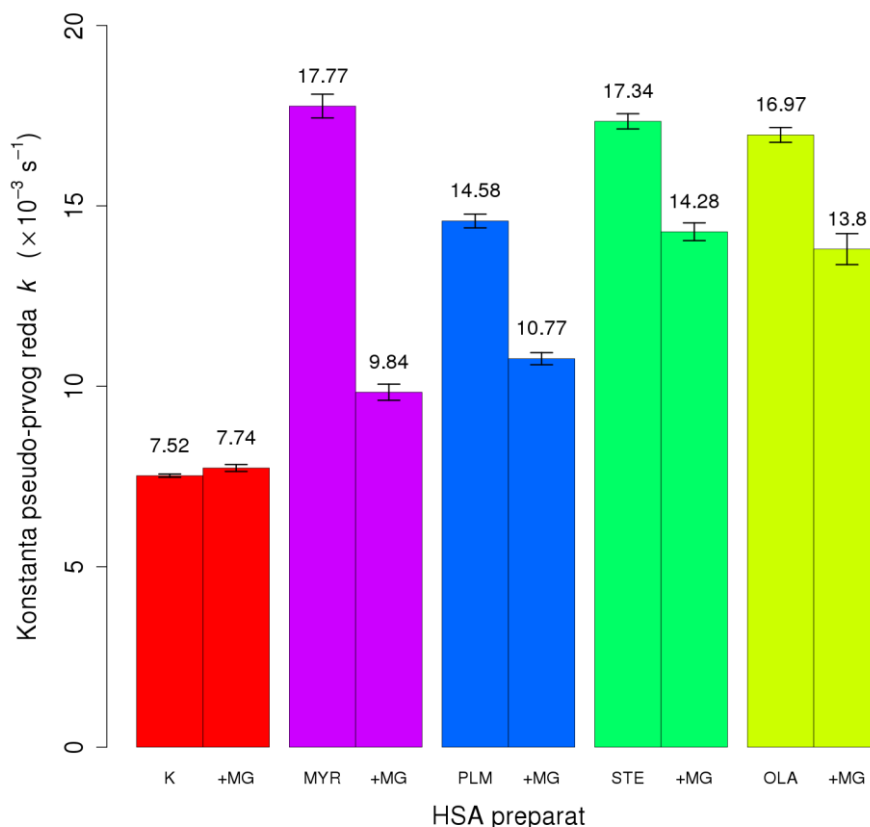


Slika 29 – Linearizovane kinetike reakcije Cys34 tiolne grupe odmašćenog HSA i MG-HSA, HSA-MK kompleksa i MG-HSA-MK kompleksa, sa DTNB-om. Modifikovani HSA (MG-HSA) je pripremljen inkubacijom HSA (0,5 mmol/L) sa metilglioksalom (10 mmol/L) u fosfatnom puferu (0,1 mol/L, pH 7,4), u toku 30 minuta na 37 °C. MYR-miristinska kiselina, PLM-palmitinska kiselina, STE-stearinska kiselina, OLA-oleinska kiselina.

Tabela 8 – Konstante brzine reakcije DTNB-a i Cys34 tiolne grupe odmašćenog MG-HSA i MG-HSA-MK- kompleksa (MYR-miristinska kiselina, PLM-palmitinska kiselina, STE-stearinska kiselina, OLA-oleinska kiselina), prethodno karbonilovanih metilglioksalom (MG). Svaki eksperiment je rađen u triplikatu.

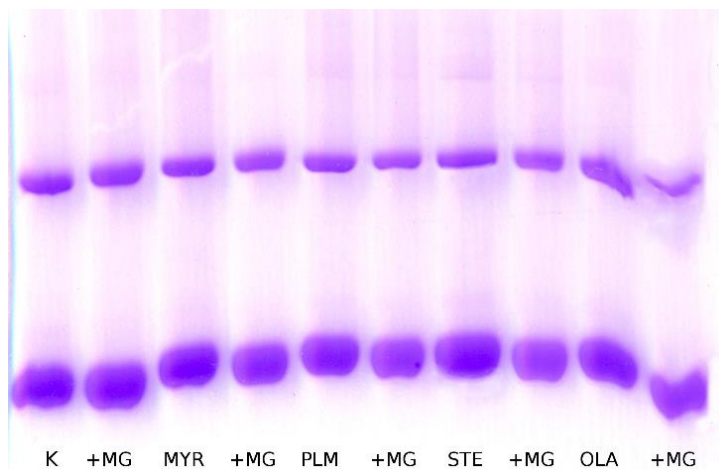
Cys34 tiolna grupa...	$k \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
MG-HSA (kontrola)	$7,74 \pm 0,10$
MG-HSA-MYR	$9,84 \pm 0,22$
MG-HSA-PLM	$10,77 \pm 0,17$
MG-HSA-STE	$14,28 \pm 0,25$
MG-HSA-OLA	$13,80 \pm 0,43$

Vrednosti konstanti brzine reakcije, dobijene za tiolnu grupu odmašćenog HSA, nemodifikovanog (Tabela 5) i modifikovanog metilglioksalom (MG-HSA) (Tabela 8), su gotovo jednake (7.52 and $7.74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, resp.). Vezivanje masnih kiselina za HSA povećava reaktivnost tiolne grupe kod svih ispitivanih HSA-MK kompleksa (Tabela 5). Slično tome, vezane masne kiseline (miristinska, palmitinska, stearinska i oleinska) u karbonilovanom HSA (MG-HSA-MK) dovode do povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe (vrednosti k : od $9,84$ do $13,80 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, Tabela 8) u odnosu na odmašćeni karbonilovani HSA ($7,74 \pm 0,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), ali je ono manje izraženo u odnosu na nekarbonilovane HSA-MK komplekse (Slika 30). Ovo može biti posledica dodatnih promena konformacije HSA molekula tokom reakcije karbonilacije amino- i gvuanidino-grupa metilglioksalom, posebno u okolini vezivnih mesta MK kao i $9,5 \text{ \AA}$ džepu u kome se nalazi ostatak Cys34. Promena molekula HSA pri karbonilaciji, odnosno promena konformacije ispitana je PAG elektroforezom (Slika 31) i spektrofluorimetrijskim merenjima (Slika 32).

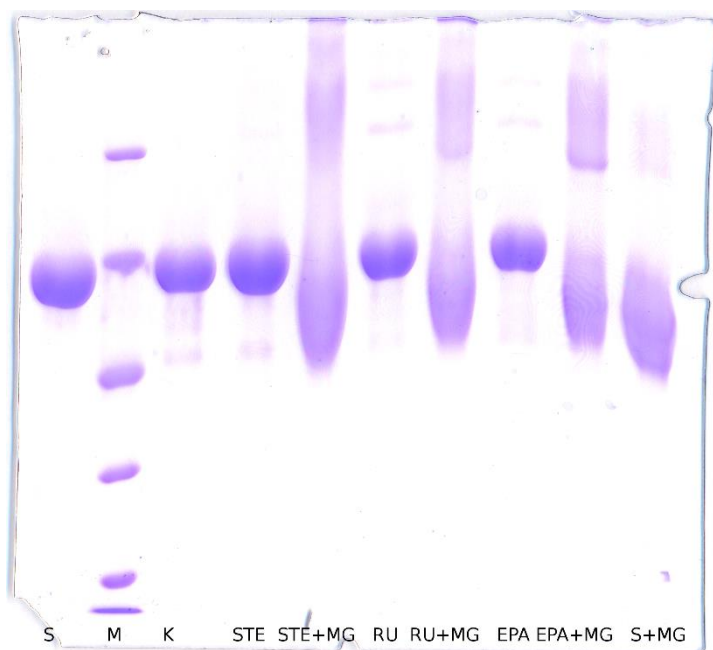


Slika 30 - Poređenje konstanti brzine reakcije pseudo-prvog reda DTNB-a i Cys34-SH grupa različitih preparata HSA, pre i posle modifikovanja metilglioksalom: K-odmašćeni HSA i karbonilovani HSA (+MG); HSA-MK (MYR, STE, PLM, OLA) kompleksi i odgovarajući karbonilovani MG-HSA-MK preparati (+MG).

Nakon modifikacije HSA-MK kompleksa metilglioksalom dolazi do povećanja pokretljivosti MG-HSA-MK preparata (smanjenja pozitivne šarže zbog modifikacije amino- i gvandino-grupa) u poređenju sa HSA-MK kompleksima (Slika 31a). Na SDS PAG elektroforegramu (Slika 31b) uočava se veoma široka traka u oblasti nekoliko kilodaltona, oko trake koja odgovara nemodifikovanom HSA, čime je potvrđeno da se pri inkubaciji (u trajanju od 6h da bi promena bila uočljivija) HSA-MK sa metilglioksalom dobijaju proizvodi različitog stepena karbonilacije.



(a)

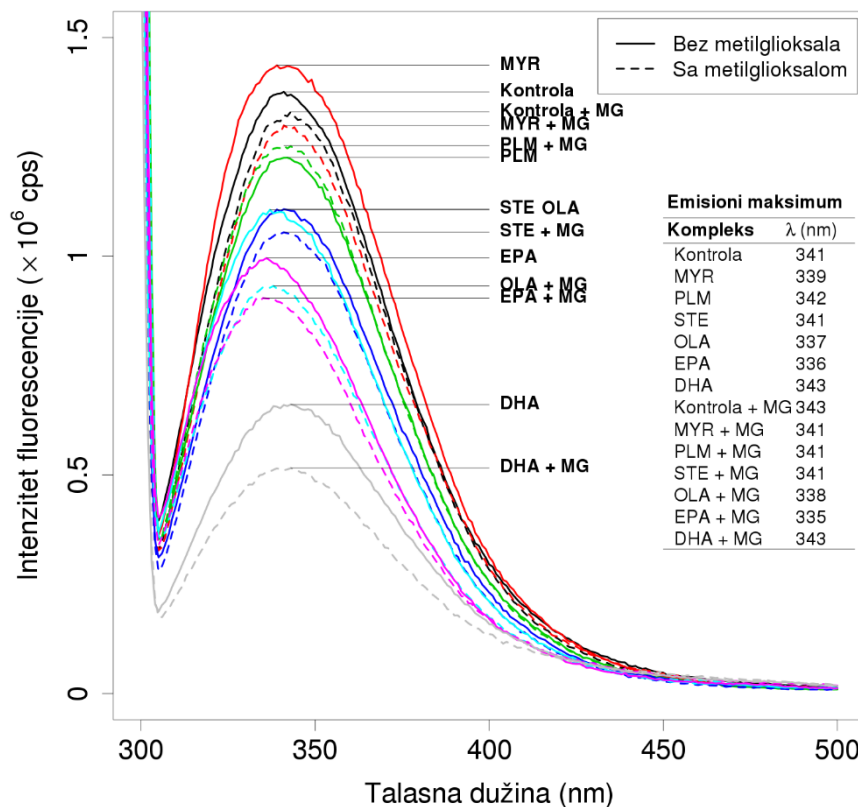


(b)

Slika 31 - (a) Nativna PAG elektroforeza (9,5 % gel) odmašćenog HSA (K) i HSA-MK kompleksa (MK: MYR-miristinska kiselina, PLM-palmitinska kiselina, STE-stearinska kiselina, OLA-oleinska kiselina) i odgovarajućih karbonilovanih MG-HSA-MK preparata (+MG). Po traci je nanošeno 7 μ g proteina koji su obojeni CBB-om. (b) SDS PAG elektroforeza uzoraka (8 % gel). K: kontrola (odmašćeni HSA); S: standard HSA (komercijalni HSA); M: molekularni markeri za SDS PAG elektroforezu (116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4 kDa); EPA: kompleks HSA- eikozapentenska kiselina; RU: kompleks HSA-masne kiseline iz ribljeg ulja

Da dolazi do dodatne promene konformacije HSA-MK kompleksa pri karbonilaciji metilglioksalom dokazano je poređenjem emisionih fluorescentnih spektara HSA-MK i MG-HSA-MK kompleksa, dobijenih nakon ekscitacije na 295 nm (Slika 32) Intenzitet fluorrescencije na maksimumu emisije kod gotovo svih karbonilovanih MG-HSA-MK kompleksa je niži od odgovarajućih HSA-MK kompleksa, a dolazi i do blagih pomeranja maksimuma emisije kod nekih kompleksa.

U slučaju odstupanja, dobijenog za uticaj dužine niza MK na reaktivnost tiolne grupe, koje je ispoljila miristinska kiselina ($k=17,77\pm 0,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) u odnosu na PLM ($k=14,58\pm 0,19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), uočava se da karbonilacija HSA-MK kompleksa metilglioksalom dovodi da povećanje vrednosti konstanti brzine reakcije tiolne grupe i DTNB-a korelira sa povećanjem dužine ugljovodoničnog niza MK u seriji miristinska, palmitinska i stearinska kiselina, i do sličnih vrednosti konstanti za komplekse HSA-stearinska i HSA-oleinska kiselina (Slika 30). Ovakav trend dodatno potvrđuje da se karbonilacijom HSA metilglioksalom modifikuju lokalne strukture, koje menjaju uticaj vezanih MK na terciarnu strukturu molekula HSA.



Slika 32 - Emisioni spektri HSA-MK kompleksa i odgovarajućih metilglioksalom karbonilovanih MG-HSA-MK preparata (+MG), dobijeni nakon ekscitacije na 295 nm. Kontrola: odmašćeni HSA; MYR: kompleks HSA-miristinska kiselina; PLM: kompleks HSA-palmitinska kiselina; STE: kompleks HSA-stearinska kiselina; OLA: kompleks HSA-oleinska kiselina; EPA: kompleks HSA-eikozapentenska kiselina; DHA: kompleks HSA-dokozaheksaenska kiselina.

Vrednosti konstanti brzine reakcije tiolne grupe i DTNB-a, dobijene za sve karbonilovane komplekse HSA i masnih kiselina (MG-HSA-MK) bile su od 1,3 do 1,9 puta veće nego za odmašćeni karbonilovani HSA (MG-HSA, Tabela 3). Uprkos činjenici da je koncentracija metilglioksala (10 mmol/L), upotrebljena za karbonilaciju HSA *in vitro*, mnogo veća od koncentracije pri normalnim fiziološkim uslovima i u dijabetesu (Phillips and Thornalley 1993, Lapolla, Flamini et al. 2003), može se zaključiti da molekuli HSA, sa vezanim masnim kiselinama i modifikovani

metilglioksalom, još uvek imaju značajan potencijal kao hvatači metilglioksala, odnosno vezivanje masnih kiselina dovodi do povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe. Pored toga, kako je HSA najzastupljeniji protein plazme (koncentracije oko 0,6 mmol/L), tiolna grupa ostatka Cys34 HSA doprinosi značajno antioksidativnom potencijalu plazme, jer učestvuje sa oko 80 % u ukupnoj koncentraciji tiola u plazmi (Ogasawara, Mukai et al. 2007, Rondeau i Bourdon 2011, Clerici, Colombo et al. 2014) Stoga, smanjenje reaktivnosti tiolne grupe u MG-HSA-MK kompleksima (karbonilovani HSA) u poređenju HSA-MK kompleksima (nemodifikovani HSA) može uticati na antioksidativni kapacitet slobodne Cys34 tiolne grupe.

4.4. Određivanje sadržaja neesterifikovanih masnih kiselina vezanih za humani serum-albumin

Jedan od ciljeva ove teze je bio i procena reaktivnosti Cys34 tiolne grupe humanog serum-albumina izolovanog iz realnih uzoraka, sa različitim sadržajem vezanih masnih kiselina. Stoga je bilo neophodno odrediti sadržaj masnih kiselina vezanih za HSA.

U literaturi je opisano više metoda za kvantifikaciju MK u različitim biološkim uzorcima. Gasno-hromatografska (GC) metoda kvantifikacije MK je veoma precizna i reproduktivna metoda (Dodds, McCoy et al. 2005), ali je dugotrajna, i ako je polazni materijal rastvor HSA koncentracije oko 0.5 mmol/L, za ekstrakciju MK potrebna je znatna zapremina polaznog rastvora, a potom je neophodno MK prevesti u odgovarajuće metil-estre. Sa druge strane, određivanje kvantitativnog sastava ekstrakta MK (primenom internog C13:0 standarda poznate koncentracije) nije uvek neophodno, pogotovu ako, kao u slučaju HSA-MK kompleksa, postoje razlike u afinitetima vezivanja različitih MK od strane HSA (Petitpas, Grune et al. 2001). Dakle, GC analiza je nezamenljiva u ispitivanju profila MK u različitim uzorcima, ali za svakodnevno određivanje ukupnog sadržaja MK neophodna je jeftinija, vremenski manje zahtevna metoda, za koju je potrebna manja zapremina uzorka. Nekoliko metoda opisanih u literaturi zadovoljava ove kriterijume. Najčešće su to spektrofotometrijske metode, zasnovane na građenju soli masnih kiselina sa jonima prelaznih metala (često bakra i kobalta) u vodenoj fazi, njihovoj ekstrakciji hloroformom, zatim kompleksiranju jona

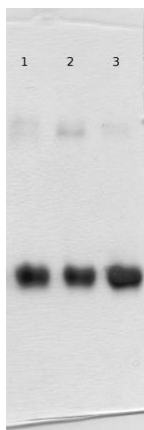
prelaznih metala odgovarajućim reagensom da se nagradi bojeni proizvod, i potom merenju apsorbance na određenoj talanoj dužini (Smith 1975, Tinnikov and Boonstra 1999).

Za potrebe određivanja sadržaja MK vezanih za HSA, u okviru ove teze, ispitano je nekoliko spektrofotometrijskih metoda. Međutim, ni jedna od njih nije dala zadovoljavajuće rezultate verovatno zbog: interakcija (interferencija) jona bakra/kobalta sa HSA, i sa komponentama pufera, kao i zbog nanomolskih količina MK, koje su ispod limita detekcije ovih metoda. Takođe, ekstrakcija soli masnih kiselina sa organskim rastvaračem je ključni korak u ovim metodama. Gotovo je nemoguće postići reproduktivnost razdvajanja faza i ekstrakciju u ponavljenim eksperimentima, tako da je ovaj korak glavni izvor eksperimentalnih grešaka.

Spektrofotometrijske kinetičke metode, koje koriste neke enzime metabolizma MK (Jebens and Sejersted 1992), povezane sa NAD/NADH kofaktorima za standardnu kvantifikaciju na 339 nm, nisu takođe pogodne za svakodnevnu analizu zbog visoke cene analiza, uporedljive ili čak više od komercijalne GC analize. Stoga je, u cilju brzog, jednostavnog, pouzdanog, tačnog i tehnički manje zahtevnog određivanja ukupne količine MK vezanih za HSA optimizovana qTLC metoda, koja se zasniva na tankoslojnom hromatografskom razdvajanju nepolarnih jedinjenja i koncentrovanju svih MK u jednoj hromatografskoj tački, potom na bojenju TLC pločice, prevođenu hromatograma u digitalni video zapis i potom denzitometrijskoj analizi digitalne slike primenom odgovarajućeg softverskog rešenja razvijenog u R-u.

4.4.1. Ekstrakcija masnih kiselina sa HSA

Kako je cilj istraživanja bio i da se sagledaju promene reaktivnosti Cys34 tiolne grupe humanog serum-albumina u realnim uzorcima (u karbonilnom stresu), sa različitim sadržajem vezanih masnih kiselina, bilo je neophodno prvo optimizovati uslove za oslobađanje i ekstrakciju MK sa izolovanog HSA. HSA je izolovan iz seruma taloženjem sa amonijum-sulfatom (Jovanović et al 2013). Dobijeni preparati ne sadrže druge proteine, koji bi mogli da vežu lipide i da interferiraju sa određivanjem MK, što je dokazano PAG elektroforezom (Slika 33).



Slika 33 - Nativna PAG elektroforeza HSA izolovanog iz humanih seruma (linije 1 i 2) i komercijalnog HSA preparata (linija 3). Gornje traka, slabijeg intenziteta, odgovaraju dimeru HSA.

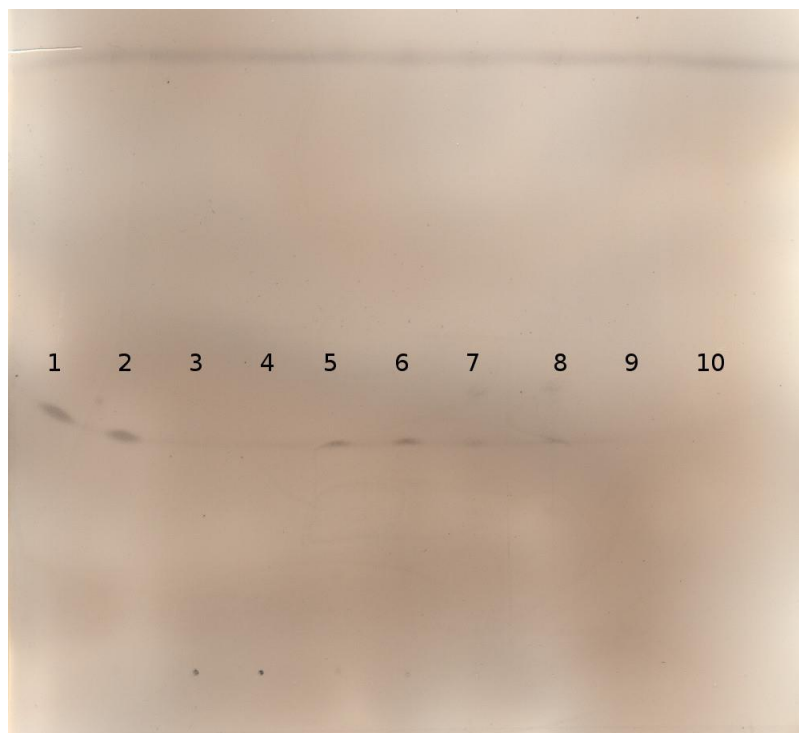
Efikasnost ekstrakcije MK sa izolovanog HSA je prvi ključni korak u kvantifikaciji MK. Da bi ekstrakcija MK bila što efikasnija, ispitani su različiti agensi (0,5 mol/L natrijum-sulfat, 3 mol/L natrijum-hlorid i 0,5 mol/L bakar(II)-sulfat) za izolovanje (brzo izdvajanje soli MK pre ekstrakcije) u kiseloj sredini (sa hlorovodoničom, sumpornom i fosfornom kiselinom koncentracije 1 mol/L), koji omogućavaju oslobađanje masnih kiselina iz kompleksa HSA-MK. Pri izolovanju sa natrijum-hloridom i natrijum-sulfatom dolazilo je do stvaranja stabilnih emulzija i do smanjenja limita detekcije. Najefikasnija ekstrakcija je postignuta kada je izolovanje rađeno bakar(II)-sulfatom u prisustvu fosforne kiseline. Fosforna kiselina omogućava da MK budu u protonovanom obliku, nerastvornom u vodi, a bakar(II)-sulfat povećava jonsku silu, postiže „salting-out“ efekat i denaturaciju proteina, čime se MK lakše oslobađaju iz mesta vezivanja. Bakar (II)-sulfat gradi u vodi rastvoran kompleks sa bilirubinom (Adhikari, Joshi et al. 1998), koji je verovatno najvažnija interferirajuća supstanca (zbog stalnog prisustva i vezivanja za albumin) u daljoj ekstrakciji MK organskim rastvaračima.

Sledeći korak bilo je pronalaženje odgovarajuće smeše organskih rastvarača u kojoj se MK dobro rastvaraju. Primena smeše hloroform-metanol (2:1) (stanardna ekstrakcija MK po Folču) se pokazala nepogodnom zbog nedovoljno dobrog razdvajanja slojeva između hloroforma i vodene faze, čestog formiranja emulzija, i hloroforma kao donje

faze u pomenutom tečnom sistemu ekstrakcije, što je veoma nepogodno prilikom mikroekstrakcija u Eppendorf mikrotubama ili epruvetama. . Kao najbolji sistem pokazala se smeša n-heptan-hloroform (4 : 1, v/v). Prednost ove smeše u odnosu na čisti n-heptan je veća rastvorljivost MK u smeši, a u odnosu na čisti hloroform je što je gustina smeše 0,84 g/mL na 25 °C, dok je gustina zakišljenog rastvora bakar(II)-sulfata 1,15 g/mL, te je time smeša heptan-hloroform gornja faza nakon ekstrakcije i lakše se pipetira. Pored toga, smeša heptan-hloroform je pogodnija za direktnu qTLC od Folčovog reagensa jer lakše isparava i ne oštećuje matriks silika-gela. Koraci ekstrakcije MK detaljno su opisani u Poglavlju 3.3.9.

4.4.2. TLC masnih kiselina ekstrahovanih sa HSA

Dobijeni ekstrakti MK nanose se na TLC pločicu kao što je opisano u Poglavlju 3.3.10. Uslovi razdvajanja optimizovani su tako da se sve MK srednjeg i dugog lanca koncentruju kao jedna tačka, tj. da R_f vrednosti za različite MK budu jednake, kao i da se ukupne MK, ekstrahovane sa HSA iz realnih uzoraka, takođe koncentruju u jednoj tački. Analiza je rađena na velikoj TLC ploči (20×20 cm), na koju je nanošen i potencijalni kontaminant bilirubin (direktno kao heptan-hloroformski rastvor, i kao dodatak 0,5 mmol/L rastvoru stearinske kiseline i potom ekstrahovan i nanet) (Slika 34). Bilirubin se u fazama obrade i dobijanja ekstrakta MK u potpunosti uklanja. Potencijalni drugi hidrofobni molekuli (supstance koje se transportuju sa HSA, fiziološki prisutni steroidni hormoni i različiti ksenobiotici), koji su mogli biti ekstrahovani sa HSA izolovanog iz seruma nisu detektovani, verovatno zbog znatno niže koncentracije u odnosu na MK. Bilirubin se takođe nalazi u koncentraciji znatno nižoj od koncentracije MK, međutim zbog stalne prisutnosti u cirkulaciji razmatran je kao mogući kontaminant.



Slika 34 - Razvijena TLC ploča sa uzorcima: 1,2: stearinska kiselina (standardna priprema); 3,4: bilirubin (direktno nanošenje rastvora bilirubina u smeši n-heptan-hloroform); 5,6: HSA + stearinska kiselina + bilirubin; 7,8: MK ekstrahovane sa uzorka HSA iz seruma pacijenta; 9,10: čist rastvor za ekstrakciju (n-heptan-hloroform 4:1, v/v).

4.4.3. Upotreba skenera u dobijanju digitalnog zapisa TL hromatograma pogodnog za dalju denzitometrijsku analizu

Kvantitativna TL hromatografija ranije je umnogome zavisila od primene skupih optičkih denzitometrijskih skenera čiji je princip u osnovi da TLC pločicu skenira liniju po liniju osvetljavajući i mereći intenzitet apsorbance ili fluorescence (Zhang and Lin 2006). Sa druge strane, sistemi za analizu slike imaju drugačiji koncept, koji se zasniva na digitalizaciji slike i potom analizi digitalnog zapisa (Johnson 2000, Askal, Khedr et al. 2008). Takav pristup značajno pojeftinjuje metodu kvantitativne TL hromatografije, jer omogućava primenu uobičajenih računarskih periferija, za razliku od skupih denzitometrijskih optičkih skenera. U literaturi su opisana dva pristupa za dobijanje digitalne slike TLC pločice, upotrebom skenera ili digitalne kamere sa CCD senzorom (Zhang and Lin 2006). Upotreba skenera ima prednost u odnosu na CCD kameru jer

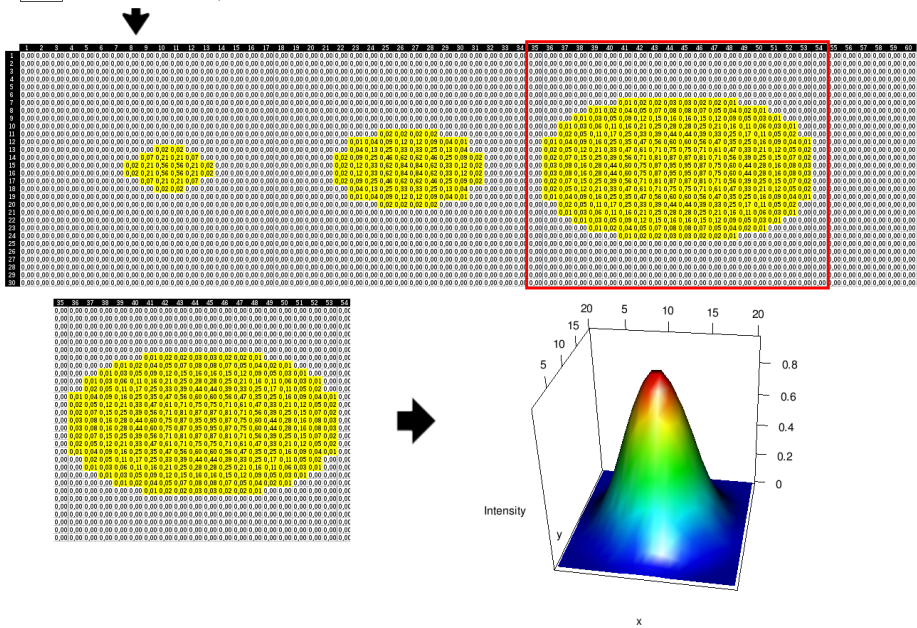
skener koristi uniformno osvetljenje tokom procesa digitalizacije, za razliku od kamere gde je osvetljenje promenljivo i teško ga je u potpunosti kontrolisati. Sa druge strane, prednost CCD kamere je mogućnost osvetljavanja UV lampom što je pogodno za komercijalne TLC ploče koje fluoresciraju na 254 nm, dok je kod skenera bez velikih modifikacija to nemoguće.

4.4.4. Algoritam za denzitometrijsku analizu TLC pločica

Ideja da se pri analizi TLC pločica koristi slobodno dostupni softver dovela je do pokušaja primene ImageJ programa. Alati u okviru „analyze gel“ opcije ImageJ 1.49s omogućavaju standardne tehnike u denzitometrijskoj analizi i dobijanje izračunatih površina na osnovu selektovanih tačaka. Nedostatak u primeni ImageJ programa pojavio se tokom analize više TLC pločica sa istom standardnom serijom usled loše povezanosti programa sa drugim statističkim paketima, ali i nedostatka opcije za automatsko uklanjanje pozadinskog šuma. Zbog toga je razvijena posebna alatka u R-u koja je omogućavala analizu slike i statističku obradu denzitometrijskih podataka u istom okruženju. U daljem tekstu sledi detaljniji opis algoritma, a sama primena programa opisana je u CRAN repozitorijumu paketa qtlc (dostupnom na adresi <https://cran.r-project.org/web/packages/qtlc/index.html>) (Pavićević 2016).

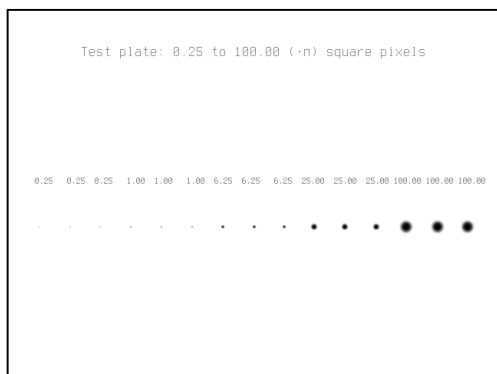
Prvi korak je konvertovanje TLC digitalne slike u dvodimenzionalni niz sa dimenzijama koje odgovaraju širini i visini slike tako da svaki piksel ima tri koordinate u nizu: pozicije koje odgovaraju x i y koordinatama kao na pločici i treću dimenziju koja je intenzitet boje (Slika 35). Budući da je TLC skenirana kao RGB slika sa 8-bitnim zapisom svakog kanala (crvenog, zelenog i plavog), ona je prvo konvertovana u sliku sa sivom skalom prema intenzitetu sa vrednostima intenziteta u opsegu 0 – 1, tako da vrednosti bliže 0 odu ka beloju boji, a 1 ka crnoj. Konverzija je načinjena primenom odavno prihvaćene formule $Y = 0,30R + 0,59G + 0,11B$ za konverziju RGB slike u boji u sivu skalu prema intenzitetu (Poynton 1998).

••• Tiff slika (60 x 30 piksela)

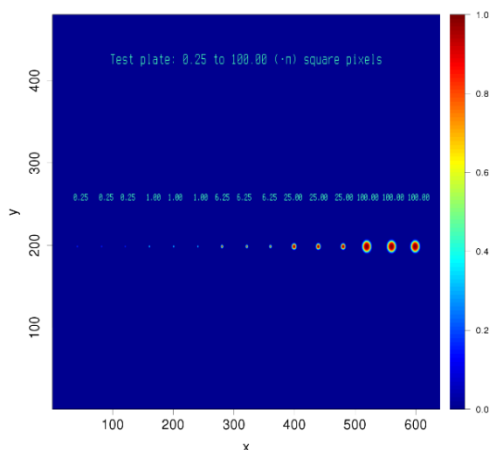


Slika 35 - Proces dobijanja denzitometrijskih podataka iz skenirane slike. Prvi korak je konvertovanje slike u dvodimenzionalni niz, nakon čega se selektovanjem okoline tačke pravi novi niz koji sadrži vrednosti tačke iz kojih se računa intenzitet boje.

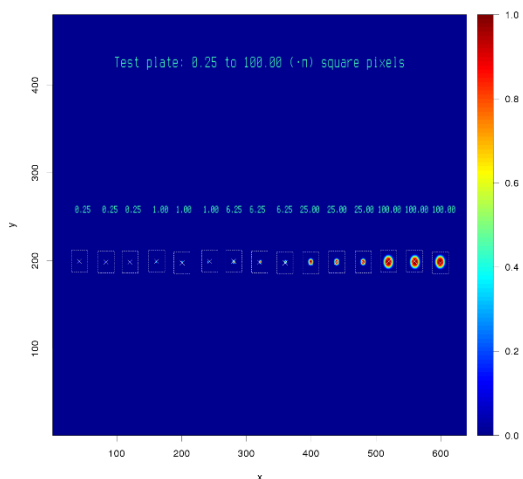
U sledećem koraku manuelno su selektovani centri tačaka na TLC -u. Nakon toga, potrebno bilo je definisati dimenzije tačke koje su opisane kao pravougaona površina željenih dimenzija identična za sve tačke. Prednost identičnih dimenzija pravougaone površine za svaku tačku je u kasnijim koracima predviđanja i eliminisanja šuma, oduzimanjem intenziteta šuma od intenziteta tačke, odn. signala, kao i u formiranju liste nizova istih dimenzija od osnovnog niza cele TLC pločice (tzv. array slicing) za svaku tačku, što umnogome olakšava i ubrzava računanje denzitometrijske površine. Poslednji koraci u denzitometrijskoj analizi slike su sumiranje vrednosti niza svake tačke i konstruisanje standardne prave na osnovu zavisnosti poznate koncentracije od denzitometrijske površine, ili pak očitavanje koncentracije na osnovu poznate denzitometrijske površine. Na Slici 36 prikazana je analiza test pločice, koja se koristi za testiranje algoritma nakon instalacije qtlc biblioteke. Nakon linearizacije dobijena je prava $y = 1,310x + 0,195$, sa koeficijentom korelacije $R^2 = 1,000$.



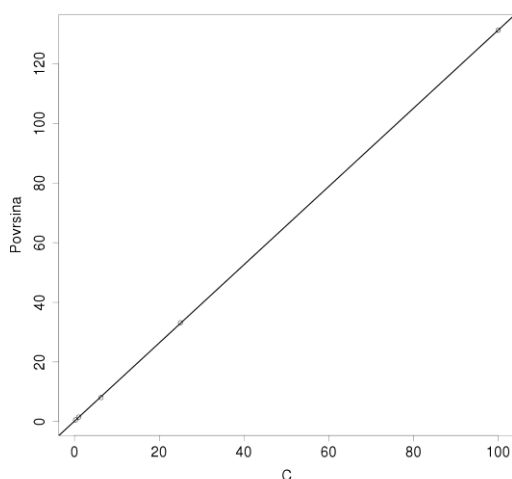
(a)



(b)



(c)

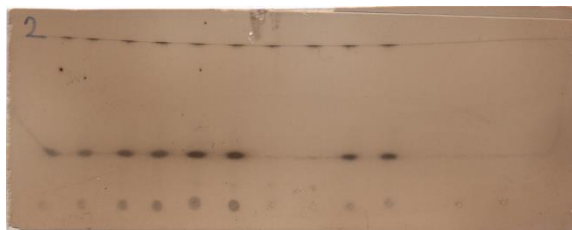


(d)

Slika 36 - Primer test pločice - koraci u kvantifikaciji: (a) Izgled test pločice za proveru rada programa (vrednosti su u a.u. i predstavljaju površinu u kvadratnim pikselima); (b) učitana pločica sa mapom intenziteta boje (0: vrednosti bliže beloj boji na originalnog slici – plavo prikazani u intenzitetu, 1: vrednosti bliže crnoj boji – crveno prikazane u intenzitetu); (c) markirane oblasti tačaka; (d) linearni model proračunatih denzitometrijskih površina u odnosu na „koncentracije“ odn. arbitrarne jedinice (kvadratne piksele).

4.4.5. Bojenje razvijene TLC pločice, izvori i uklanjanje šuma

Šum nakon bojenja TLC pločice je, u zavisnosti od tehnike bojenja, prisutan u većoj ili manjoj meri kao lažne male tačke sa slučajnom distribucijom preko cele TLC pločice. Gotovo je neizbežno prisutan nakon bojenja sumpornom kiselinom (opisanim u Poglavlju 3.3.10) i verovatno je povezan sa reakcijom sumporne kiseline i cementa koji se nalazi u osnovi komercijalne TLC ploče i povezuje sloj silika- gela sa aluminijskom podlogom. Slika 37 prikazuje tipičnu TLC pločicu obojenu sumpornom kiselinom – zagrevanjem.



Slika 37 - Izgled TLC pločice sa uzorcima stearinske kiseline i MK iz realnih uzoraka, koja je obojena potapanjem pločica u 8 % rastvor sumporne kiseline u 99 % etanolu, a potom sušenjem i zagrevanjem pištoljem za vreli vazduh do formiranja stabilne boje.

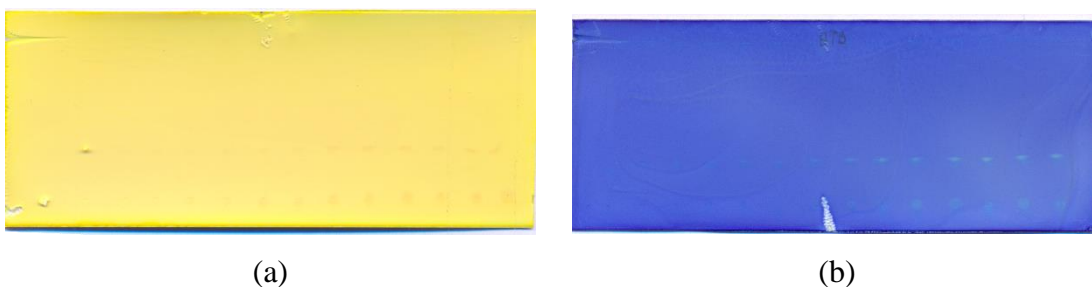
Pored bojenja sumpornom kiselinom, primenjeni su i drugi reagensi za bojenje (Sudan-crveno, bromtimol-plavo, metil-crveno, bromkrezol-zeleno). Sudan-crveno se rutinski koristi za bojenje lipidnih čestica u histopreparatima za svetlosnu mikroskopiju, pa se pokazao najpogodnijom bojom i za izazivanje MK na TLC pločici (Slika 38). Za selektivno bojenje MK upotrebljen je zasićeni rastvor Sudan-crvenog u sistemu rastvarača etanol : aceton : voda (50 : 35 : 15, v/v/v). Pločica je bojena potapanjem i mešanjem u rastvoru boje u trajanju od 1 minuta, nakon čega je višak boje odliven i pločica brzo prenesena u rastvor za obezbojavanje (70 % etanol). Obezbojavanje, uz konstantno mešanje, traje 5 – 10 minuta i procenjuje se vizuelno, kada se tačke jasno uočavaju kao crvene mrlje, a pozadina je bledocrvene boje. Nakon obezbojavanja, pločice se ocede i polako suše u struji toplog vazduha oko 1 minut, nakon čega su spremne za skeniranje. Ovako obojene pločice su omogućavale pouzdano određivanje

MK sa limitom detekcije od 0,1 mmol/L MK i limitom kvantifikacije od 1 mmol/L. Limit kvantifikacije je 10 puta veći od limita dobijenog pri bojenju sumpornom kiselinom (0,1 mmol/L), tako da su potrebne znatno veće količine uzoraka MK da bi se postigla linearnost.



Slika 38 – Izgled TLC pločice sa uzorcima stearinske kiseline, koja je obojena Sudan-crvenim.

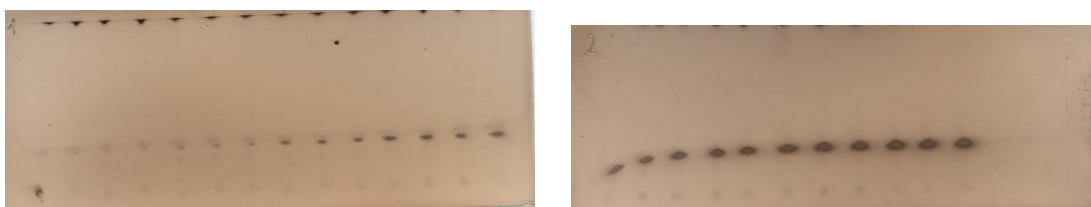
Drugi načini bojenja, poput rastvora bromokrezol-zelenog, metil-crvenog (Slika 39a) i bromotimol-plavog (Slika 39b) nisu omogućavali limite detekcije (0.2 mmol/L, 1 mmol/L i 1 mmol/L, redom) pogodne za određivanje sadržaja MK vezanih za HSA u uslovima, opisanim napred. Pored toga, boja je bila isuviše nestabilna za rutinski rad.



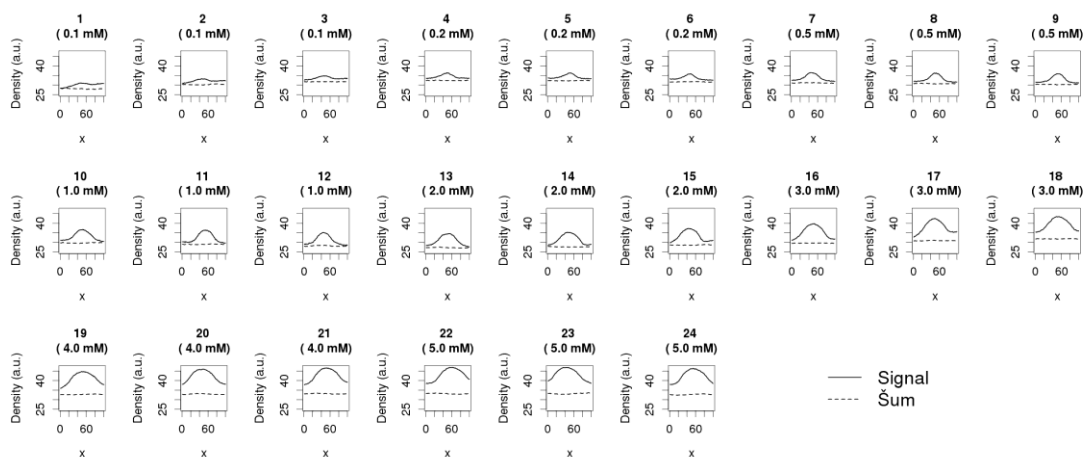
Slika 39 - TLC pločice na kojima su za bojenje MK primenjeni:(a) metil-crveno; (b) bromotimol- plavo.

Uprkos šumu koji se javlja pri bojenju sumpornom kiselinom, njen 8 % rastvor u 99 % etanolu se pokazao najpogodnijim za rutinske analize, jer je stabilan, i omogućava zadovoljavajući limit kvantifikacije od 0,1 mmol/L MK. Stoga je dalja optimizacija softverskog rešenja za procenu i uklanjanje šuma rađena samo za TLC pločice bojene

ovim reagensom. Algoritam za procenu pozadinskog šuma baziran je na aproksimaciji da se nivo šuma može matematički predvideti na osnovu uzorkovanja šuma iznad ili ispod označenih tačaka, i potom konstruisanja polinomske regresije sa polinomom n-1 reda (n je ukupni broj tačaka). Zatim se, primenom polinomske jednačine, za svaku tačku računa odgovarajući nivo šuma i on se oduzima od intenziteta tačke. Takav pristup je baziran na dobro poznatom i u analitičkoj hemiji često primenjivanom Savitzky-Golay filteru, koji se bazira na pretpostavci da je nivo šuma moguće predvideti prostom lokalnom regresijom između bliskih tačaka (Komsta 2009). Slika 40b prikazuje odnose signala i šuma za svaku tačku (koncentraciju stearinske kiseline) pojedinačno sa TLC pločice date na Slici 40a.



(a)



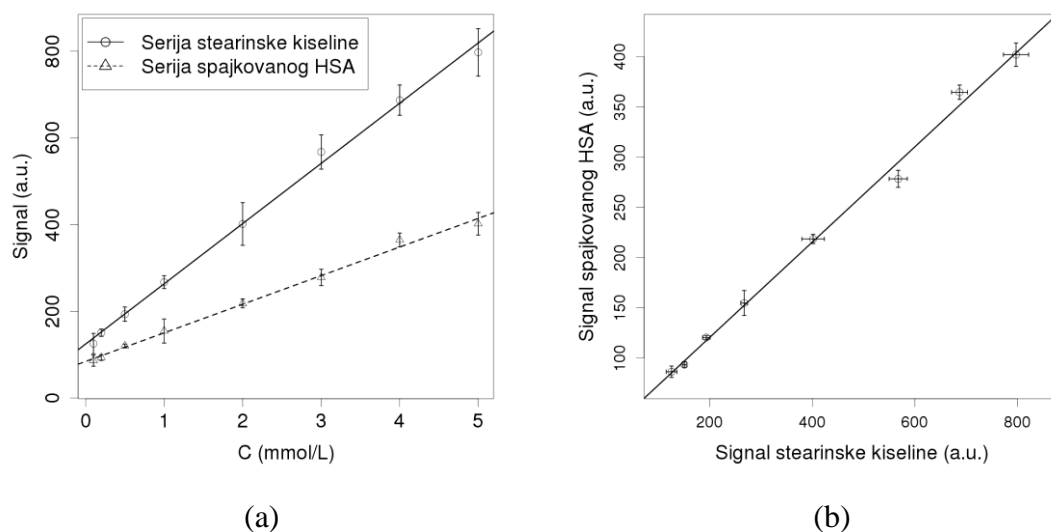
(b)

Slika 40 - Razvijena TLC pločica sa standardnom serijom rastvora stearinske kiseline (0,1 - 5,0 mmol/L) (a) i sa izračunatim odnosom signala i šuma za svaku tačku sa TLC pločice (b).

Kalibraciona kriva za određivanje MK vezanih za HSA konstruisana je sa standardnom serijom rastvora stearinske kiseline, u opsegu koncentracija 0,1 do 5,0 mmol/L. Ovaj opseg odgovara sadržaju MK vezanih za HSA u fiziološkim i patološkim uslovima (Heald, Arnold et al. 1967, Rogiers 1981, Boden 1998). Dobijena je prava $y = (124,58 \pm 8,17) + (138,88 \pm 3,11) X$ sa koeficijentom korelacije $R = 0,997$.

4.4.6. Validacija metode

Iako HSA kao protein ne može direktno da utiče na određivanje MK pomoću TLC-a, ipak može proizvesti efekat matriksa. Provera doprinosa HSA kao matriksa, na određivanje MK opisanom TLC metodom, ispitana je tako što su uzorci stearinske kiseline (standardne serije koncentracija od 0,1 do 5,0 mmol/L) spajkovani komercijalnim HSA, tako da konačna koncentracija HSA bude u svakom uzorku 0,5 mmol/L. Svako određivanje je rađeno u pet ponovaka. Dobijena kriva, $y = (84,45 \pm 4,91) + (65,99 \pm 1,87) X$, je linearna u datom opsegu koncentracija, sa koeficijentom korelacije $R=0,994$. Vrednosti nagiba krivih dobijenih za uzorke stearinske sa i bez prisustva HSA se značajno razlikuju ($65,99 \pm 1,87$ and $138,88 \pm 3,11$, redom) (Slika 41). Međutim, veoma visok koeficijent korelacije ($r = 0.994$) između izračunatih denzitometrijskih površina mrlja, dobijenih za uzorke stearinske kiseline sa i bez dodatog HSA, pokazuje stabilan odnos između svih parova koncentracija (Slika 41b). Budući da je efekat HSA kao matriksa evidentan i značajan, prilikom određivanja sadržaja MK vezanih za HSA neophodno je koristiti kalibracionu krivu konstruisanu sa stearinskom kiselinom u prisustvu HSA. U patološkim stanjima (hroničnim patologijama poput metaboličkog sindroma (Paschos and Paletas 2009), dijabetesa (Roden, Stingl et al. 2000, Staehr, Hother-Nielsen et al. 2003), ateroskleroze (Smith and Wilson 2006) i kardiovaskularnih bolesti (Jouven, Charles et al. 2001, Oliver 2001, Lu, Stewart et al. 2012)), u kojima je povišen nivo slobodnih MK, nije utvrđeno da se sadržaj HSA značajno menja. Stoga se, zbog efekta matriksa, koncentracija HSA od 0,5 mmol/L može koristiti i prilikom određivanja MK vezanih za HSA u patološkim stanjima.



Slika 41 – (a) Standardne krive stearinske kiseline (0.1–5.0 mmol/L) bez ($y=124.581+138.881X$) i u prisustvu 0.5 mmol/L HSA ($y=84.441+65.989A$) (b) Poređenje signala (denzitometrijskih površina, uključujući standardne greške) za parove koncentracije stearinske, dobijene bez i sa HSA.

Kao što je napred rečeno, za vreme isoljavanja i ekstrakcije MK, kompleksi bakar(II) jona i bilirubina ostaju u vedenoj fazi. Uticaj bilirubina na određivanje MK ispitan je sa koncentracijama koje su 2,5 puta veće od fizioloških, ali efekat bilirubina nije utvrđen.

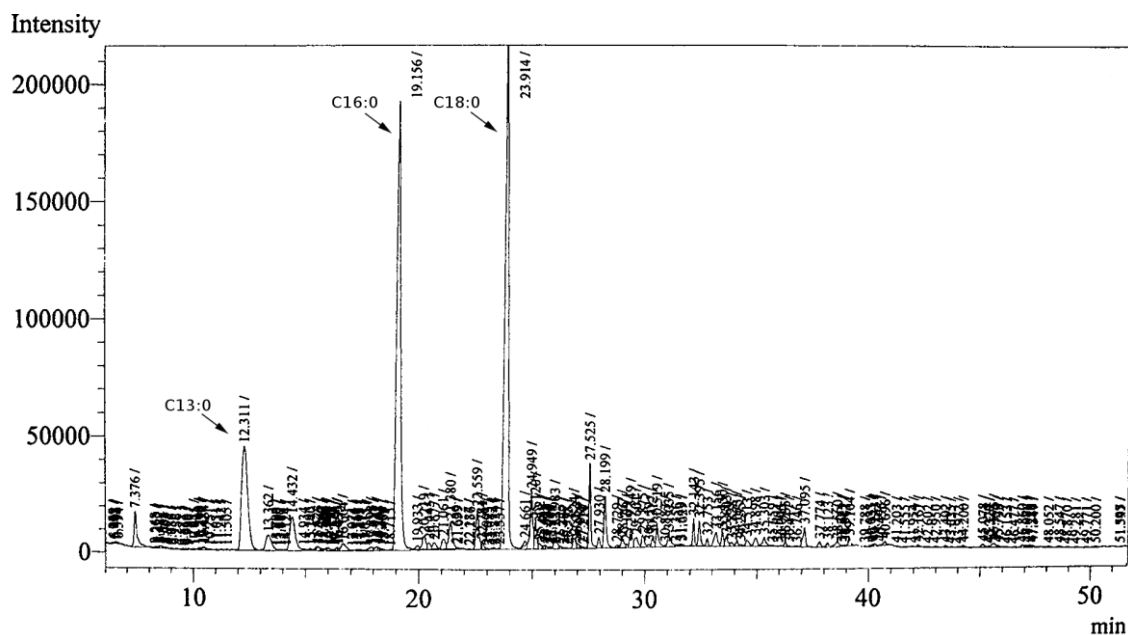
Preciznost qTLC metode za određivanje sadržaja MK proverena je u pet ponavljanja za svaku od tri koncentracije stearinske kiseline (0,15, 1,25 i 3,75 mmol/L) iz opsega linearnosti. Dobijene vrednosti od $0,15 \pm 0,007$ mmol/L, $1,27 \pm 0,029$ mmol/L i $3,72 \pm 0,051$ mmol/L, sa relativnim standardnim devijacijama od 4,7 %, 2,3 % i 1,4 %, pokazuju dobru preciznost metode u ispitivanom opsegu koncentracija.

Tačnost metode proverena je metodom standardnog dodatka, pri čemu su dobijene rikaveri vrednosti od 97,2 do 102,5 % (Tabela 9). Tačnost je dodatno proverena poređenjem rezultata qTLC i GC određivanja (Slika 42) MK izolovanih sa HSA (prethodno inkubiranog sa stearinskom i palmitinskom kiselinom). Dobijeni rezultati (za sadržaj stearinske: $2,37 \pm 0,11$ mmol/L naspram 2,29 mmol/L i za sadržaj

palmitinske kiseline: $0,39 \pm 0,01$ naspram $0,37$ mmol/L, redom) su u dobroj saglasnosti. Može se zaključiti da je razvijena qTLC metoda precizna i tačna u opisanim eksperimentalnim uslovima. Metoda je primenjena za određivanje sadržaja MK vezanih za HSA izolovanog iz realnih uzoraka seruma zdravih osoba i osoba obolelih od dijabetesa sa metaboličkim sindromom, čime je omogućena procena uticaja vezivanja masnih kiselina na reaktivnost Cys34 tiolne grupe u realnim uzorcima (Poglavlje 4.5.).

Tabela 9 – Tačnost metode za određivanje MK proverena je metodom standardnog dodatka. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti pet određivanja

C (mmol/L)	Dodato (mmol/L)	Pronađeno (mmol/L)	RSD (%)	Rikaveri (%)
0,14	0,1	$0,23 \pm 0,01$	4,4	97,2
1,16	0,4	$1,54 \pm 0,07$	4,5	98,7
1,22	0,5	$1,68 \pm 0,05$	3,0	97,7
1,80	0,6	$2,46 \pm 0,09$	3,7	102,5



Slika 42 - GC hromatogram MK izolovanih sa HSA (prethodno inkubiranog sa stearinskom i palmitinskom kiselinom). Interni standard C13:0.

Kako, u odnosu na druge metode za određivanje MK/HSA, razvijena qTLC metoda zahteva značajno manje uzorka, manje je tehnički zahtevna, brza je i jeftina, pogodna je za rutinski rad u kliničkim laboratorijama. Pod normalnim fiziološkim uslovima molarni odnos MK/HSA je između 0,1 i 2,0, zavisno od dijete, starosne dobi i fizičkog stanja (Brodersen, Andersen et al. 1990). Tokom gladovanja ili ekstremnog vežbanja, i u mnogim patološkim stanjima, poput metaboličkog sindroma, dijabetesa, različitih aritmija i drugih kardiovaskularnih promena, odnos MK/HSA može da bude i iznad 6:1 (Cistola and Small 1991). Stoga se molski odnos MK/HSA (odnosno razvijena metoda za njegovo određivanje) može primeniti kao parametar u dijagnostici/proceni faktora rizika ovih patoloških stanja. Pored navedenog, ova metoda može biti alternativna metodi za procenu sadržaja IMA (ishemijom modifikovanog albumina), ranog markera ishemije miokarda, koja se zasniva na vezivanju jona kobalta za albumin, na koje može uticati vezivanje MK za HSA (Bar-Or, Rael et al. 2008). Dodatno, određivanje odnosa MK/HSA je značajno u evaluaciji procene antioksidativnog potencijala/oksidativnog stresa na osnovu sadržaja tiolne grupe Cys34 ostatka HSA (predložen parametar od

strane (Rondeau and Bourdon 2011)), u skladu sa dobijenim rezultatima da vezane MK modifikuju kinetiku reakcije slobodne tiolne grupe HSA.

4.5. Ispitivanje uticaja vezivanja masnih kiselina na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA izolovanog iz seruma pacijenata u karbonilnom stresu

Uticaj vezanih MK na reaktivnost Cys34 tiolne grupe se dodatno usložnjava u patološkim stanjima tokom kojih se javljaju reakcije glikacije (tokom kojih se dodatno menja konformacija molekula HSA), patologijama u čijem tretmanu se koriste brojni lekovi. U dijabetesu su povećani sadržaji MK, stepen glikacije/karbonilacije proteina, reaktivnih karbonilnih i kiseoničnih vrsta, tako da promene reaktivnosti tiolne grupe mogu uticati na dugoročne efekte hiperglikemije. Zbog toga je jedan od ciljeva istraživanja ove teze bio i određivanje sadržaja Cys34-SH grupe i korelacija sa sadržajem glukoze i HbA1c frakcije hemoglobina kod osoba obolelih od dijabetesa tipa 2 i metaboličkim sindromom i u kontrolnoj grupi. Posebna pažnja bila je usmerena na određivanje reaktivnosti, odnosno konstante brzine reakcije tiolne grupe HSA (sa DTNB/om), i sagledavanje njene povezanosti sa sadržajem MK vezanih za HSA u realnim uslovima.

4.5.1. Određivanje sadržaja HSA Cys34-SH grupe kod osoba sa karbonilnim stresom

Oko 70 do 80% molekula HSA u cirkulaciji poseduje Cys34 tiolnu grupu u redukovanom obliku. U manjem obimu (2 – 5 %) nalazi se u oksidovanom obliku, oko 20 - 30 % gradi disulfidnu vezu sa malim molekulima cisteinom, homocisteinom i glutationom (Stewart, Blindauer et al. 2005). Cys34-SH doprinosi i dimerizaciji molekula HSA, i u cirkulaciji je normalno prisutno 5 – 10 % dimera (Peters 1996). Sadržaj slobodne HSA Cys34 tiolne grupe određen je iz seruma kontrolne grupe (n=7, starosne dobi od 30 do 45 godina) i seruma osoba sa dijabetesom i metaboličkim sindromom (n=16, starosti od 48 do 81 godina), patoloških stanja za koja je karakteristična povećana karbonilacija proteina (Goldin, Beckman et al. 2006,

Anguizola, Matsuda et al. 2013). Uzorci su sakupljeni pri rutinskoj kliničkoj kontroli biohemijjskih parametara, nakon što su osobe informisane da će deo uzoraka biti upotrebljen u naučnom istraživanju. Vrednosti standardnih biohemijjskih parametara krvi (glukoza, HbA_{1c} i trigliceridi) preuzeti su od kliničkih laboratorija u kojima su uzorci sakupljeni, pri čemu su sve laboratorije akreditovane za obavljanje takvih analiza i podležu internoj i eksternoj proveru analitičkih parametara i dobre kliničke prakse.

HSA je iz seruma izolovan frakcionom precipitacijom amonijum-sulfatom, kao što je opisano u poglavlju 3.3.2. Koncentracija albumina određena je biuretskim reagensom i bromokrezol-zelenim i potom je svedena na 0,5 mmol/L HSA. Zatim je određen sadržaj slobodne Cys34 tiolne grupe sa DTNB-om. Sadržaj masnih kiselina vezanih za HSA određen je metodom razvijenom za ove potrebe (Pogavlje 4.4). Sva određivanja su rađena u triplikatu.

Stanje hiperglikemije, odnosno stepen glikacije/karbonilacije proteina najbolje se može pratiti određivanjem sadržaja HbA_{1c} frakcije hemoglobina (Turk, Mesic et al. 1998, Kostolanska, Jakus et al. 2009), koja je pokazatelj dugog prisustva povećanog sadržaja glukoze u krvi (karbonilnog stresa) u organizmu. Ispitivanje stepena karbonilacije HSA, primenom 2,4-DNPH kao reagensa, ne odlikava u potpunosti stanje karbonilnog stresa, jer je karbonilovani HSA meta aktivnog uklanjanja iz cirkulacije posredstvom specifičnih receptora na različitim tipovima ćelija koji prepoznaju karbonilovane forme HSA (Smith and Thornalley 1992). Kako su sadržaji glukoze (10,4±4,3 mmol/L) i HbA_{1c} (9,2±2,1%) (Tabela 10) u grupi obolelih bili statistički ($p<0,05$; $p<0,001$, redom) značajno viši od sadržaja kontrolne grupe (5,2±0,3 mmol/L; 5,1±0,4%, redom), i kako je utvrđena dobra korelacija između sadržaja glukoze i HbA_{1c} ($\rho=0,615$) može se zaključiti da je glikacija/karbonilacija proteina (karbonilni stress) u ispitivanoj grupi bila značajno prisutna. Takođe je i sadržaj masnih kiselina (2,46±0,42 mol MK/molHSA, tabela 10) i triglicerida (2,2±1,3 mmol/L, tabela 10) kod obolelih bio značajno ($p<0,001$, $p<0,05$, redom) viši od sadržaja kontrolne grupe (0,76±0,37 mol MK/molHSA i 1,1±0,3 mmol/L, redom). Uprkos tome, sadržaj Cys34 tiolne grupe obolelih (0,17±0,03 mol/L) nije se statistički značajno razlikovao od sadržaja kontrolne grupe (0,15±0,03 mol/L). Između sadržaja tiolne grupe i sadržaja glukoze i HbA_{1c} nađena je dobra korelacija ($r=0,560$ i $0,415$, redom). Dobijeni rezultati ukazuju da određivanje sadržaja HSA tiolne grupe kao parametra - markera za procenu stepena

oksidativnog/karbonilnog stresa u složenom sistemu, u kome je i sadržaj MK povećan, nije pouzdano jer na vrednosti sadržaja može da utiče dostupnost/reaktivnost Cys34 tiolne grupe. Kako je ispitivanje urađeno sa malim brojem ispitanika, neophodna je provera na većem broju uzoraka.

Tabela 10 – Pregled standardnih biohemijskih parametara krvi kod osoba sa dijabetesom i metaboličkim sindromom

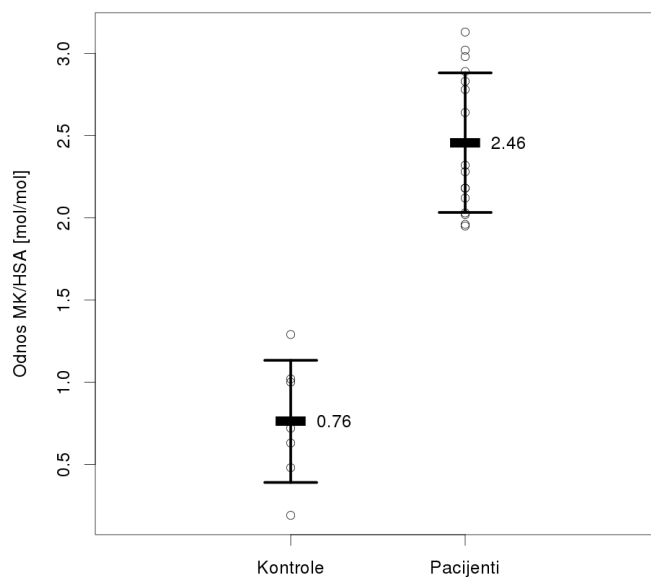
	Starost	Glukoza (mmol/L)	HbA_{1c} (%)	Trigliceridi (mmol/L)	Cys34-SH (mmol/L)
1	55	15,7	14,1	1,2	0,13
2	-	-	-	-	0,19
3	58	6,4	6,7	0,6	0,19
4	63	6,1	7,9	4,4	0,16
5	58	10,7	11,1	3	0,13
6	55	11,5	8,4	1,5	0,13
7	-	-	-	-	0,12
8	52	16,7	9,8	4,6	0,18
9	60	6,1	9	1,2	0,21
10	69	8,3	6,4	1,2	0,14
11	69	6,8	8,9	2,5	0,2
12	59	16,7	9,8	1,2	0,17
13	56	9,4	8,2	1,6	0,18
14	54	16,4	10	1	0,14
15	55	8,9	-	3,5	0,2
16	49	5,4	-	3,3	0,16
X±σ		10.4±4,3	9,2±2,1	2,2±1,3	0,17±0,03

4.5.2. Sadržaj masnih kiselina vezanih za HSA i reaktivnost Cys34 tiolne grupe kod osoba sa karbonilnim stresom

Iako je ranije navedeno da vezivanje MK za HSA može dovesti do promena redoks-svojstva tiolne grupe i njenog sulfenskog derivata, promene njene reaktivnosti prema karbonilnim jedinjenjima, odnosno promene potencijala kao „hvatača“ α -oksoaldehida u složenom sistemu, u kome je vezivanje slobodnih MK za HSA povećano, do sada nisu istraživane. Rezultati određivanja sadržaja glukoze i HbA1c (Tabele 10) su pokazali da je karbonilacija proteina bila značajna.

Sadržaj MK vezanih za HSA kod osoba obolelih od dijabetesa i metaboličkog sindroma ($2,46 \pm 0,42$ mol MK/molHSA) (Tabela 10 i Slika 43) je statistički ($p < 0,001$) značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu ($0,76 \pm 0,37$ mol MK/molHSA). Kao glavni transporter neesterifikovanih MK, HSA u normalnim fiziološkim uslovima transportuje 0,1 do 2,0 molova MK po molu HSA, što zavisi od tipa ishrane, starosnog doba, opšteg stanja organizma (Brodersen, Andersen et al. 1990), pušačkog statusa (koji nije kontrolisan u ovom ispitivanju) i lekovima koji mogu da utiču na metabolizam lipida. Taj odnos MK/HSA prelazi 2,0 u perifernoj cirkulaciji tokom gladovanja, ili ekstremne fizičke aktivnosti, kao i u patološkim stanjima poput dijabetesa (Roden, Stingl et al. 2000, Staehr, Hother-Nielsen et al. 2003), i kardiovaskularnih bolesti (Jouven, Charles et al. 2001, Oliver 2001, Smith and Wilson 2006, Lu, Stewart et al. 2012), što je potvrđeno i našim rezultatima. Usled poremećenog odgovora na insulin kod pacijenata sa dijabetesom i metaboličkim sindromom ceo metabolički put i sudbina MK u kataboličkim reakcijama je izmenjena, počevši od transporta i preuzimanja MK koji je direktno povezan sa insulinom. Transport MK je dinamički proces i zavisi od metaboličke aktivnosti različitih tkiva, fiziološkog stanja organizma, režima ishrane i gladovanja. Ukupne MK plazme brzo rastu nakon oslobađanja kateholamina (Oliver and Opie 1994), što je metabolički uslovljeno kao odgovor na hormone. Hronične patologije, poput metaboličkog sindroma, koje prate povišen nivo triglicerida i

holesterola, takođe su često praćene i povećanjem neestirifikovanih MK u plazmi, međutim povezanost nije prosti linearni odgovor usled brojnih drugih fizioloških faktora, na primer promena stila života i uzimanje lekova koji remete metabolizam holesterola i MK metabolizam u cilju snižavanja nivoa holesterola i triglicerida u plazmi.



Slika 43 – Raspodela vrednosti molskog odnosa MK/HSA u grupi osoba sa karbonilnim stresom (n=16) i u kontrolnoj grupi (n=7). Rezultati su prikazani kao $X \pm \sigma$.

Praćenje kinetike reakcije Cys34-SH grupa, HSA izolovanog iz seruma ispitanika (Tabela 11 i Tabela 12), sa DTNB-om dalo je jasni profil kinetike reakcije pseudo-prvog reda (Slika 44), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u *in vitro* istraživanjima (poglavlje 4.2.). Time je otvorena mogućnost određivanja kinetičke konstante reakcije i ispitivanje u kojoj meri patološka stanja sa povišenim oksidativnim i karbonilnim stresom utiču na sadržaj slobodne tiolne grupe HSA, odn. na fiziološki status HSA uopšteno.

Tabela 11 – Vrednosti molskog odnosa MK/HSA i kinetičkih konstanti (k) tiolne grupe HSA izolovanog iz seruma kontrolne grupe (K) (koje su dobijene računski nakon linearizacije kinetičkih parametara).

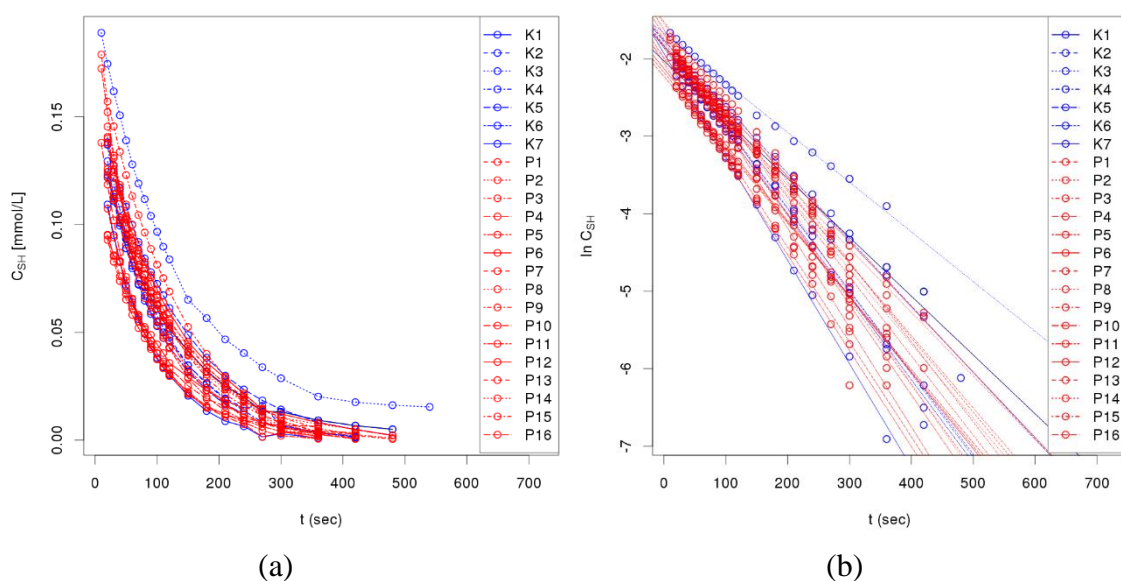
	Grupa	Starost	HSA (mmol/L)	MK (mmol/L)	MK/HSA (mol/mol)	$k \times 10^{-3}$ (s⁻¹)
1	K	-	0,53	0,68 ± 0,04	1,29	7,15
2	K	-	0,58	0,11 ± 0,01	0,19	6,41
3	K	-	0,53	0,54 ± 0,03	1,02	6,41
4	K	45	0,45	0,22 ± 0,01	0,48	6,95
5	K	30	0,48	0,48 ± 0,03	1,00	7,43
6	K	37	0,50	0,32 ± 0,02	0,63	7,31
7	K	30	0,50	0,36 ± 0,02	0,72	6,86
X±σ		35,5 ± 7,14	0,51 ± 0,04	0,39 ± 0,19	0,76±0,37	6,93±0,41

Tabela 12 - Molski odnosi MK/HSA i kinetičkih konstanti (k) tiolne grupe HSA izolovanog iz seruma pacijenata (P), (dobijeni računski nakon linearizacije kinetičkih parametara).

	Grupa	Starost	HSA (mmol/L)	MK (mmol/L)	MK/HSA (mol/mol)	$k \times 10^{-3}$ (s⁻¹)
1	P	55	0,53	1,04 ± 0,06	1,96	9,67
2	P	-	0,37	0,75 ± 0,04	2,02	9,68
3	P	58	0,55	1,53 ± 0,08	2,78	12,54
4	P	63	0,55	1,59 ± 0,08	2,89	12,8
5	P	58	0,53	1,03 ± 0,05	1,95	9,55
6	P	55	0,53	1,16 ± 0,06	2,18	10,43
7	P	-	0,46	1,21 ± 0,06	2,64	12,21
8	P	52	0,49	1,46 ± 0,08	2,98	12,34
9	P	60	0,56	1,22 ± 0,06	2,18	10,91
10	P	69	0,46	1,07 ± 0,06	2,32	11,53
11	P	69	0,46	1,05 ± 0,06	2,28	10,04

Nastavak tabele 12

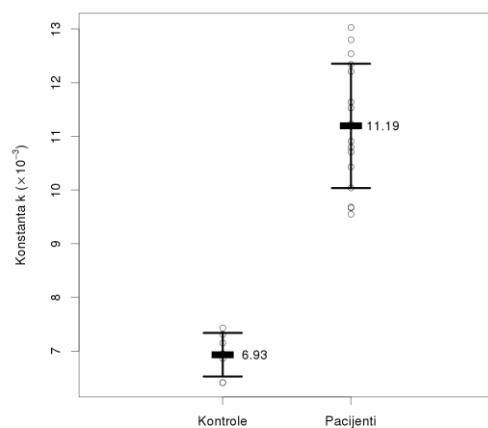
12	P	59	0,57	$1,72 \pm 0,09$	3,02	11,64
13	P	56	0,55	$1,12 \pm 0,06$	2,03	10,71
14	P	54	0,49	$1,04 \pm 0,06$	2,12	10,8
15	P	55	0,50	$1,42 \pm 0,07$	2,83	11,23
16	P	49	0,50	$1,57 \pm 0,08$	3,13	13,03
$\bar{X} \pm \sigma$		$58 \pm 5,79$	$0,51 \pm 0,05$	$1,25 \pm 0,27$	$2,46 \pm 0,42$	$11,19 \pm 1,16$



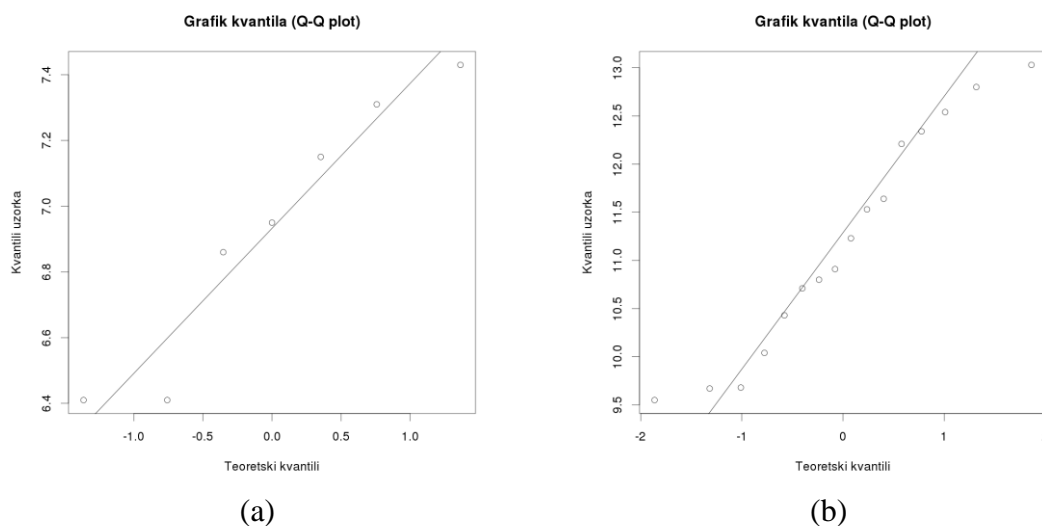
Slika 44 – (a) Kinetički tok reakcije Cys34-SH grupe (sa DTNB) HSA, izolovanog-iz seruma osoba sa karbonilnim stresom (crvena boja) i kontrolne grupe (plava boja); (b) Linearizacija kinetičkih podataka konstruisanjem semilogaritamskog grafika $\ln C = f(t)$.

Određivanjem vrednosti konstanti brzine reakcije Cys34 tiolne grupe i DTNB-a (Slika 44b) utvrđeno je da reaktivnost tiolne grupe raste kod osoba obolelih od dijabetesa i metaboličkog sindroma. Srednja vrednost konstante brzine reakcije Cys34 tiolne grupe HSA kod pacijenata ($11,19 \pm 1,16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (Tabela 12, Slika 45) je statistički ($p < 0,001$) značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu ($6,93 \pm 0,41 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (Tabela 11, Slika 45). Normalnost raspodele pojedinačnih vrednosti utvrđena je primenom Šapiro-Vilkovog testa, što potvrđuje i grafik kvantila (eng. Q-Q plot) (Slika 46). Dobijeni rezultati su u

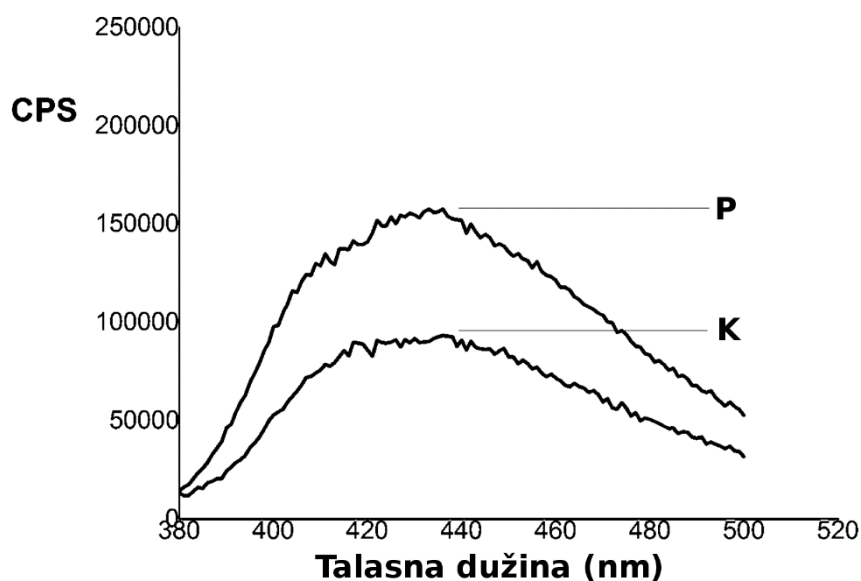
saglasnosti sa rezultatima dobijenim pri *in vitro* ispitivanju uticaja vezivanja MK (za karbonilovani HSA) na reaktivnost Cys34 tiolne grupe (poglavlje 4.3). Modifikacija HSA molekula tokom karbonilnog stresa je izražena, masne kiseline se vezuju za HSA, što zajedno dovodi do promene konformacije HSA, veće izloženosti Cys34-SH rastvaraču i porasta reaktivnosti tiolne grupe. Promena konformacije HSA izolovanog iz seruma pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu potvrđena je snimanjem fluorescentnih spektara (Slika 47).



Slika 45 – Raspodela vrednosti konstanti brzine reakcije (k) u grupi osoba sa karbonilnim stresom (n=16) i u kontrolnoj grupi (n=7). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm \sigma$.

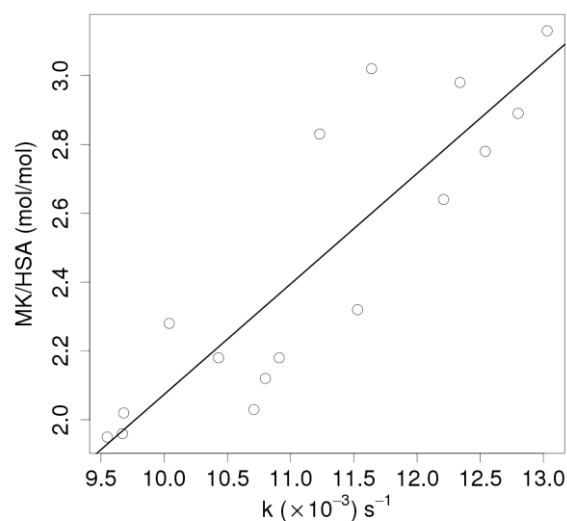


Slika 46 – Grafici kvantila za (a) kontrolnu grupu i (b) osobe obolele od tipa 2 dijabetesa i metaboličkog sindroma



Slika 47 - Emisioni spektri HSA, izolovanog iz seruma osoba sa karbonilnim stresom (P) i osoba kontrolne grupe (K), nakon ekscitacije na 295 nm.

Povezanost promena vrednosti konstante brzine reakcije (k) i odnosa MK/HSA ispitana je primenom Spirmanovog korelacionog testa. Kod obolelih sa povećanim molaskim odnosom MK/HSA ($2,46 \pm 0,42$ mol MK/mol HSA) dobijena je visoka korelacija ($\rho = 0,837$, Slika 48), a niža u kontrolnoj grupi ($0,76 \pm 0,37$ mol MK/mol HSA, $\rho = 0,400$). Veća korelacija između vrednosti k i MK/HSA kod pacijenata verovatno je posledica bolje zauzetosti specifičnih vezivnih mesta za MK na molekulu HSA usled veće koncentracije MK, i time izraženijeg doprinosa vezivanja MK za HSA na kinetiku reakcije slobodne tiolne grupe. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima dobijeni u *in vitro* eksperimentima sa odmašćenim HSA i HSA zasićenim sa MK. Na osnovu svega zaključeno je da vezivanje MK za HSA značajno doprinosi reaktivnosti Cys34-SH grupe u serumu pacijenata.



Slika 48 - Povezanost promena vrednosti konstante brzine reakcije (k) i odnosa MK/HSA kod osoba obolelih od dijabetesa i metaboličkog sindroma

Dobijeni rezultati, zajedno sa rezultatima *in vitro* ispitivanja uticaja pojedinačnih MK, različite dužine niza i zasićenosti, na reaktivnost tiolne grupe imaju značajne implikacije u predviđanju kapaciteta humanog serum-albumina kao antioksidanta i kao hvatača reaktivnih vrsta, i otvaraju mogućnosti moduliranja kapaciteta unošenjem određenih masnih kiselina kao suplemenata ishrani. Praćenje trendova promene reaktivnosti Cys34 tiolne grupe i sadržaja masnih kiselina u odnosu na druge biohemijske parametre krvi, otvara mogućnost za bolje postavljanje dijagnoze i praćenje bolesti u slučaju više metaboličkih poremećaja sa sličnim patofiziološkim promenama, poput dijabetesa tipa 2, metaboličkog sindroma i gojaznosti.

5. Zaključak

Molekul HSA pored značajnog doprinosa antioksidativnom tiolnom kapacitetu plazme u patofiziološkim stanjima, koja pored oksidativnog stresa karakteriše i povišeni nivo reaktivnih α -oksoaldehida, ima i izuzetnu ulogu u odbrani od karbonilnog stresa. Praćenje sadržaja slobodne tiolne grupe nije pouzdan parametar u proceni oksidativnog/karbonilnog stresa, jer na vrednosti sadržaja može da utiče dostupnost/reaktivnost Cys34 tiolne grupe. Međutim, praćenje reaktivnosti i kinetičke karakterizacije reakcije Cys34-SH sa DTNB-om omogućava poređenje konstanti brzine reakcije pseudo-prvog reda kompleksa HSA sa različitim ligandima, nezavisno od početnog sadržaja slobodne tiolne grupe. Određivanje kinetičke konstante je pouzdan parametar i u *in vivo* uslovima, jer predstavlja prosečnu reaktivnost HSA bez obzira na početni sadržaj slobodne tiolne grupe.

Ispitivanje reaktivnosti Cys34 tiolne grupe *in vitro* su pokazala da vezivanje masnih kiselina (različite dužine lanca i zasićenosti: miristinske, palmitinske, stearinske, oleinske, eikozapentenske i dokozaheksaenske kiseline, kao i MK izolovanih iz ribljev ulja), za HSA dovodi do povećanja vrednosti konstanti brzine (k) reakcije tiolne grupe (i DTNB) (k kompleksa HSA-MK: od $14,58 \pm 0,19 \times 10^{-3}$ do $26,02 \pm 1,06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ u odnosu na k HSA: $7,52 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), odnosno njene reaktivnosti za 2 do 3,5 puta. Vrednost povećanja reaktivnosti zavisi od dužine ugljovodoničnog niza masnih kiselina i od stepena njihove nezasićenosti. Stearinska i oleinska kiselina ispoljavaju slične efekte na reaktivnost HSA-SH (k vrednosti iznose $17,34 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ i $16,97 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom), a najjači efekat ispoljava polinezasićena eikozapentaenska kiselina ($k=26,02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Od ispitivanih zasićenih MK, najveća vrednost konstante brzine reakcije dobijena je pri vezivanju miristinske kiseline za HSA ($k=17,77 \pm 0,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), što može biti posledica izuzetne komplementarnosti njenog molekula sa vezivnim mestima na molekulu HSA, koja najviše utiču na izloženost tiolne grupe rastvaraču.

Vrednosti k , dobijene pri vezivanju različitih MK, koreliraju u velikom stepenu ($r=0,927$) sa vrednostim izloženosti/dostupnosti Cys34 tiolne grupe rastvaraču, koje su dobijene primenom programa ASAView na osnovu kristalografskih podataka za različite HSA-MK komplekse. To ukazuje na direktnu vezu između reaktivnosti tiolne

grupe ostatka Cys34 i promene konformacije molekula HSA pri vezivanju MK, što je dokazano snimanjem fluorescentnih spektara odmašćenog HSA i različitih HSA-MK kompleksa. Promena konformacije molekula HSA zavisi od tipa i broja molekula MK vezanih za HSA.

Vrednost konstante brzine reakcije Cys34 tiolne grupe kompleksa HSA-MK ribljeg ulja ($17,17 \pm 0,35 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) je 2,4 puta veća od vrednosti dobijene za SH grupu odmašćenog HSA, i nalazi se između vrednosti dobijenih za tiolne grupe kompleksa HSA-OLA i HSA-DHA. Polazeći od zastupljenosti MK u preparatu ribljeg ulja (određene GC-MS metodom: 37 % EPA, 32 % DHA, 8 % OLA, i pretpostavljajući da je doprinos prosečnoj kinetičkoj konstanti aditivan, računski dobijena vrednost za kinetičku konstantu iznosi $16,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Izračunata vrednost konstante brzine reakcije se dobro slaže sa eksperimentalno određenom vrednošću ($17,17 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

Saznanje da reaktivnost ostatka Cys34 zavisi od tipa masne kiseline vezane za HSA otvara mogućnosti modulacije reaktivnosti tiolne grupe, odnosno kapaciteta kao antioksidanta i hvatača reaktivnih vrsta, unošenjem određenih MK kao suplemenata ishrani. Takođe, dodatno ukazuju na pozitivne efekte primene ribljeg ulja kao suplementa u ishrani.

Vezivanje masnih kiselina (zasićenih, mono- i polinezasićenih) za HSA utiče i na potencijal tiolne grupe ostatka Cys34 kao hvatača metilglioksala. U *in vitro* uslovima karbonilacije metilglioksalom (model-sistem za reaktivne α -oksoaldehide koji se generišu u karbonilnom stresu), tiolna grupa kompleksa HSA-zasićene MK je više karbonilovana (od 53 do 65%) u odnosu na tiolnu grupu odmašćenog HSA (45%). Sličan procenat karbonilacije tiolne grupe (od oko 60 %), dobijen je i za HSA-OLA kompleks. U slučaju kompleksa HSA sa polinezasićenim MK dugog niza, HSA-EPA i HSA-DHA, kao i kompleksa sa MK, koje su izolovane iz ribljeg ulja, dolazi do brzog i izrazitog pada sadržaja HSA-SH, te je određivanje stepena karbonilacije otežano. Dakle, kapacitet HSA-SH grupe kao hvatača metilglioksala raste pri vezivanju MK, a porast zavisi od vrste MK vezane za HSA.

Kako se reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA menja u složenom sistemu, u kome je i vezivanje slobodnih MK za HSA i stepen karbonilacije molekula HSA povećan (kao što

je slučaj u dijabetesu), ispitano je sa kompleksima HSA-MK, koji su *in vitro* modifikovani metilglioksalom (MG-HSA-MK).

Vezane masne kiseline (miristinska, palmitinska, stearinska i oleinska) u karbonilovanom HSA (MG-HSA-MK) dovode do povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe od 1,3 do 1,9 puta (k vrednosti: od 9,84 do $13,80 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) u odnosu na odmašćeni karbonilovani HSA ($7,74 \pm 0,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), ali je ono manje izraženo u odnosu na nekarbonilovane HSA-MK komplekse. Ovo može biti posledica dodatnih promena konformacije HSA molekula tokom reakcije karbonilacije amino- i gvanidino-grupa metilglioksalom, što je potvrđeno PAG elektroforezom i spektrofluorimetrijskim merenjima. Odstupanje dobijeno pri ispitivanju reaktivnosti tiolne grupe posle vezivanja MK različite dužine lanca ($k(\text{HSA-miristinska}) = 17,77 \pm 0,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ vs. $k(\text{HSA-palmitinska}) = 14,58 \pm 0,19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) izostalo je pri vezivanju MK za karbonilovani MG-HSA. Povećanje vrednosti konstante brzine korelira sa povećanjem dužine ugljovodoničnog niza MK u seriji miristinska, palmitinska i stearinska kiselina. Vrednosti konstanti dobijene za SH-grupu kompleksa MG-HSA-stearinska i MG-HSA-oleinska kiselina su gotovo jednake. Ovim je dodatno potvrđeno da pri karbonilaciji HSA dolazi do promena lokalne strukture, što menja uticaj i vezanih MK na terciarnu strukturu molekula HSA. Uprkos činjenici da je koncentracija metilglioksala (10 mmol/L), upotrebljena za karbonilaciju HSA *in vitro*, mnogo veća od koncentracije pri normalnim fiziološkim uslovima i u dijabetesu, može se zaključiti da molekuli HSA, sa vezanim masnim kiselinama i modifikovani metilglioksalom, još uvek imaju značajan potencijal kao hvatači metilglioksala, odnosno vezivanje masnih kiselina dovodi do povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe. Pored toga, kako je HSA najzastupljeniji protein plazme (koncentracije oko $0,6 \text{ mmol/L}$), tiolna grupa ostatka Cys34 HSA doprinosi značajno antioksidativnom potencijalu plazme, jer učestvuje sa oko 80 % u ukupnoj koncentraciji tiola u plazmi. Stoga, smanjenje reaktivnosti tiolne grupe u MG-HSA-MK kompleksima (karbonilovani HSA) u poređenju HSA-MK kompleksima (nemodifikovani HSA) može uticati na antioksidativni kapacitet slobodne Cys34 tiolne grupe.

Uticaj vezanih MK na svojstva HSA Cys34 tiolne grupe kao „hvatača“ reaktivnih vrsta u realnim uzorcima seruma, ispitana je kod osoba obolelih od dijabetesa tipa 2 i sa metaboličkim sindromom ($n=16$), tj. osoba sa utvrđenom povećanom glikacijom

proteina, karbonilnim stresom i hiperlipidemijom, kao i u kontrolnoj grupi (n=7), određivanjem sadržaja Cys34 tiolne grupe, MK vezanih za HSA, glukoze, HbA1c i reaktivnosti tiolne grupe. Sadržaji MK ($2,46 \pm 0,42$ mol MK/molHSA), glukoze ($10,4 \pm 4,3$ mmol/L) i HbA1c ($9,2 \pm 2,1\%$) su statistički ($p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,001$, redom) značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu ($0,76 \pm 0,37$ mol MK/molHSA; $5,2 \pm 0,3$ mmol/L mmol/L; $5,1 \pm 0,4\%$, redom). Između sadržaja tiolne grupe i sadržaja glukoze i HbA1c nađena je slaba korelacija ($r = 0,560$ i $0,415$, redom). Srednja vrednost konstante brzine reakcije Cys34 tiolne grupe HSA izolovanog iz seruma dijabetičara ($11,19 \pm 1,16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) je statistički ($p < 0,001$) značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu ($6,93 \pm 0,41 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), što je povezano sa povećanim sadržajem MK ($1,25 \pm 0,27$ mmol/L) i triglicerida ($2,2 \pm 1,3$ mmol/L) u serumu obolelih (u odnosu na kontrolnu grupu: $0,39 \pm 0,19$ mmol/L, $1,1 \pm 0,3$ mmol/L, redom). Između konstanti brzine i molskog odnosa MK/HSA, kod obolelih nađena je visoka korelacija ($\rho = 0,837$), i nešto niža u kontrolnoj grupi ($\rho = 0,400$). Veća korelacija između parametara k i MK/HSA kod osoba u karbonilnom stresu verovatno je posledica bolje zauzetosti specifičnih vezivnih mesta za MK na molekulu HSA (usled većih koncentracija MK) i time izraženijeg uticaja vezivanja MK za HSA na kinetiku reakcije slobodne tiolne grupe, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u *in vitro* ispitivanjima. Na osnovu svega, zaključeno je da vezivanje MK za HSA značajno doprinosi reaktivnosti HSA Cys34 tiolne grupe, odnosno njenom potencijalu kao hvatača reaktivnih vrsta. Promene reaktivnosti tiolne grupe u ovim uslovima mogu uticati na dugoročne efekte hiperglikemije u ovom patološkom stanju. Dobijeni rezultati imaju važne implikacije na mogućnost modulacije reaktivnosti/antioksidativnih svojstava tiolne grupe pomoću MK kao suplemenata.

Da bi se sa sigurnošću mogao proceniti uticaj MK, vezanih za HSA u realnim uzorcima, na reaktivnost Cys34 tiolne grupe razvijena je qTLC metoda za određivanje sadržaja vezanih MK i razvijena je algoritam za denzitometrijsku analizu. HSA je izolovan iz seruma taloženjem sa amonijum-sulfatom. Optimizovani su uslovi za izolovanje i ekstrakciju MK iz HSA, i kvantifikaciju pomoću qTLC. Metoda je precizna (RSD vrednosti: od 1,4 do 4,7 %) i tačna, što je provereno metodom standardnog dodatka (rikaveri vrednosti od 97,2 do 102,5 %), kao i slaganjem vrednosti sadržaja MK određenih pomoću qTLC i GC. U odnosu na druge metode za određivanje odnosa MK/HSA potrebna je znatno manja količina uzorka, kraće vreme za izvođenje analize,

metoda je manje tehnički zahtevna i jeftina, i zato pogodna za rutinski rad u kliničkim laboratorijama. Tokom gladovanja ili ekstremnog vežbanja, i u mnogim patološkim stanjima, poput metaboličkog sindroma, dijabetesa, različitih aritmija i drugih kardiovaskularnih promena, odnos MK/HSA može da bude i iznad 6:1. Stoga se molski odnos MK/HSA (odnosno razvijena metoda za njegovo određivanje) može primeniti kao parametar u dijagnostici/proceni faktora rizika kod ovih patoloških stanja. Metoda, takođe, može biti alternativna metodi za procenu sadržaja IMA (ishemijom modifikovanog albumina), ranog markera ishemije miokarda, koja se zasniva na vezivanju jona kobalta za albumin, na koje može uticati vezivanje MK za HSA. Dodatno, u skladu sa dobijenim rezultatima da MK vezane za HSA modifikuju kinetiku reakcije slobodne tiolne grupe HSA, određivanje odnosa MK/HSA je značajno u evaluaciji procene antioksidativnog potencijala/oskidativnog stresa na osnovu sadržaja tiolne grupe Cys34 ostatka HSA molekula.

6. Literatura

Acimovic, J. M., V. B. Jovanovic, V. D. Sreckovic, A. Z. Penezic Romanjuk and L. M. Mandic (2013). "Monitoring of the human serum albumin carbonylation level through determination of guanidino group content." Anal Biochem **433**(2): 162-167.

Acimovic, J. M., B. D. Stanimirovic, N. Todorovic, V. B. Jovanovic and L. M. Mandic (2010). "Influence of the microenvironment of thiol groups in low molecular mass thiols and serum albumin on the reaction with methylglyoxal." Chem Biol Interact **188**(1): 21-30.

Adhikari, S., R. Joshi and C. Gopinathan (1998). "Bilirubin as an anti precipitant against copper mediated denaturation of bovine serum albumin: formation of copper-bilirubin complex." Biochim Biophys Acta **1380**(1): 109-114.

Agarwal, R. P., R. A. McPherson and M. Phillips (1983). "Rapid degradation of disulfiram by serum albumin." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **42**(2): 293-310.

Ahmad, S., M. Gromiha, H. Fawareh and A. Sarai (2004). "ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins." BMC Bioinformatics **5**: 51.

Alvarez, B., S. Carballal, L. Turell and R. Radi (2010). "Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin." Methods Enzymol **473**: 117-136.

Anguizola, J., R. Matsuda, O. S. Barnaby, K. S. Hoy, C. Wa, E. DeBolt, M. Koke and D. S. Hage (2013). "Review: Glycation of human serum albumin." Clin Chim Acta **425**: 64-76.

Anraku, M., V. T. Chuang, T. Maruyama and M. Otagiri (2013). "Redox properties of serum albumin." Biochim Biophys Acta **1830**(12): 5465-5472.

Askal, H. F., A. S. Khedr, I. A. Darwish and R. M. Mahmoud (2008). "Quantitative thin-layer chromatographic method for determination of amantadine hydrochloride." Int J Biomed Sci **4**(2): 155-160.

- Bahr, R., A. T. Hostmark, E. A. Newsholme, O. Gronnerod and O. M. Sejersted (1991). "Effect of exercise on recovery changes in plasma levels of FFA, glycerol, glucose and catecholamines." Acta Physiol Scand **143**(1): 105-115.
- Bal, W., M. Sokolowska, E. Kurowska and P. Faller (2013). "Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates." Biochim Biophys Acta **1830**(12): 5444-5455.
- Balaban, S., L. S. Lee, M. Schreuder and A. J. Hoy (2015). "Obesity and cancer progression: is there a role of fatty acid metabolism?" Biomed Res Int **2015**: 274585.
- Bar-Or, D., L. T. Rael, R. Bar-Or, D. S. Slone, C. W. Mains, N. K. Rao and C. G. Curtis (2008). "The cobalt-albumin binding assay: insights into its mode of action." Clin Chim Acta **387**(1-2): 120-127.
- Baynes, J. W., S. R. Thorpe and M. H. Murtiashaw (1984). "Nonenzymatic glucosylation of lysine residues in albumin." Methods Enzymol **106**: 88-98.
- Bergman, R. N. and M. Ader (2000). "Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." Trends Endocrinol Metab **11**(9): 351-356.
- Bern, M., K. M. Sand, J. Nilsen, I. Sandlie and J. T. Andersen (2015). "The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery." J Control Release **211**: 144-162.
- Bhattacharya, A. A., S. Curry and N. P. Franks (2000). "Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures." J Biol Chem **275**(49): 38731-38738.
- Bhattacharya, A. A., T. Grune and S. Curry (2000). "Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin." J Mol Biol **303**(5): 721-732.
- Boden, G. (1998). "Free fatty acids (FFA), a link between obesity and insulin resistance." Front Biosci **3**: d169-175.

- Brodersen, R., S. Andersen, H. Vorum, S. U. Nielsen and A. O. Pedersen (1990). "Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma." Eur J Biochem **189**(2): 343-349.
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-820.
- Bulaj, G., T. Kortemme and D. P. Goldenberg (1998). "Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides." Biochemistry **37**(25): 8965-8972.
- Cameron, A. D., B. Olin, M. Ridderstrom, B. Mannervik and T. A. Jones (1997). "Crystal structure of human glyoxalase I--evidence for gene duplication and 3D domain swapping." EMBO J **16**(12): 3386-3395.
- Carter, D. C. and J. X. Ho (1994). "Structure of serum albumin." Adv Protein Chem **45**: 153-203.
- Chen, R. F. (1967). "Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment." J Biol Chem **242**(2): 173-181.
- Chen, Y. and S. Vaidyanathan (2012). "A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids." Anal Chim Acta **724**: 67-72.
- Cistola, D. P. (1998). "Fat sites found!" Nat Struct Biol **5**(9): 751-753.
- Cistola, D. P. and D. M. Small (1991). "Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ¹³C nuclear magnetic resonance study." J Clin Invest **87**(4): 1431-1441.
- Clerici, M., G. Colombo, F. Secundo, N. Gagliano, R. Colombo, N. Portinaro, D. Giustarini, A. Milzani, R. Rossi and I. Dalle-Donne (2014). "Cigarette smoke induces alterations in the drug-binding properties of human serum albumin." Blood Cells Mol Dis **52**(4): 166-174.
- Colmenarejo, G. (2003). "In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin." Med Res Rev **23**(3): 275-301.

- Curry, S., P. Brick and N. P. Franks (1999). "Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies." Biochim Biophys Acta **1441**(2-3): 131-140.
- Curry, S., H. Mandelkow, P. Brick and N. Franks (1998). "Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites." Nat Struct Biol **5**(9): 827-835.
- de Almeida, I. T., H. Cortez-Pinto, G. Fidalgo, D. Rodrigues and M. E. Camilo (2002). "Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis." Clin Nutr **21**(3): 219-223.
- Desai, K. M., T. Chang, H. Wang, A. Banigesh, A. Dhar, J. Liu, A. Untereiner and L. Wu (2010). "Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy?" Can J Physiol Pharmacol **88**(3): 273-284.
- Dodds, E. D., M. R. McCoy, L. D. Rea and J. M. Kennish (2005). "Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry." Lipids **40**(4): 419-428.
- Dole, V. P. (1956). "A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose." J Clin Invest **35**(2): 150-154.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." Arch Biochem Biophys **82**(1): 70-77.
- Evans, T. W. (2002). "Review article: albumin as a drug--biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure." Aliment Pharmacol Ther **16 Suppl 5**: 6-11.
- Fanali, G., A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano and P. Ascenzi (2012). "Human serum albumin: from bench to bedside." Mol Aspects Med **33**(3): 209-290.
- Farmer, A., V. Montori, S. Dinneen and C. Clar (2001). "Fish oil in people with type 2 diabetes mellitus." Cochrane Database Syst Rev(3): CD003205.

Faure, P., L. Troncy, M. Lecomte, N. Wiernsperger, M. Lagarde, D. Ruggiero and S. Halimi (2005). "Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal." Diabetes Metab **31**(2): 169-177.

Ferrer, M. L., R. Duchowicz, B. Carrasco, J. G. de la Torre and A. U. Acuna (2001). "The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study." Biophys J **80**(5): 2422-2430.

Galis, Z., L. Ghitescu and M. Simionescu (1988). "Fatty acids binding to albumin increases its uptake and transcytosis by the lung capillary endothelium." Eur J Cell Biol **47**(2): 358-365.

Ghinea, N., M. Eskenasy, M. Simionescu and N. Simionescu (1989). "Endothelial albumin binding proteins are membrane-associated components exposed on the cell surface." J Biol Chem **264**(9): 4755-4758.

Ghuman, J., P. A. Zunsain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri and S. Curry (2005). "Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin." J Mol Biol **353**(1): 38-52.

Goldin, A., J. A. Beckman, A. M. Schmidt and M. A. Creager (2006). "Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury." Circulation **114**(6): 597-605.

Gryzunov, Y. A., A. Arroyo, J. L. Vigne, Q. Zhao, V. A. Tyurin, C. A. Hubel, R. E. Gandley, Y. A. Vladimirov, R. N. Taylor and V. E. Kagan (2003). "Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants." Arch Biochem Biophys **413**(1): 53-66.

Han, E., Y. Yun, G. Kim, Y. H. Lee, H. J. Wang, B. W. Lee, B. S. Cha, B. S. Kim and E. S. Kang (2016). "Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Diabetic Nephropathy Progression in Patients with Diabetes and Hypertriglyceridemia." PLoS One **11**(5): e0154683.

Heald, F. P., G. Arnold, W. Seabold and D. Morrison (1967). "Plasma levels of free fatty acids in adolescents." Am J Clin Nutr **20**(9): 1010-1014.

Hein, K. L., U. Kragh-Hansen, J. P. Morth, M. D. Jeppesen, D. Otzen, J. V. Moller and P. Nissen (2010). "Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin." J Struct Biol **171**(3): 353-360.

Ho, R. J. and H. C. Meng (1969). "A simple and ultrasensitive method for determination of free fatty acid by radiochemical assay." Anal Biochem **31**(1): 426-436.

Ishima, Y., D. Chen, J. Fang, H. Maeda, A. Minomo, U. Kragh-Hansen, T. Kai, T. Maruyama and M. Otagiri (2012). "S-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects." Bioconj Chem **23**(2): 264-271.

Ishima, Y., H. Hoshino, T. Shinagawa, K. Watanabe, T. Akaike, T. Sawa, U. Kragh-Hansen, T. Kai, H. Watanabe, T. Maruyama and M. Otagiri (2012). "S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents." J Pharm Sci **101**(9): 3222-3229.

Jebens, E. and O. M. Sejersted (1992). "Enzymatic microdetermination of plasma and serum free fatty acids." Scand J Clin Lab Invest **52**(7): 717-724.

Johnson, M. E. (2000). "Rapid, Simple Quantitation in Thin-Layer Chromatography Using a Flatbed Scanner." Journal of Chemical Education **77**(3): 368.

Jouven, X., M. A. Charles, M. Desnos and P. Ducimetiere (2001). "Circulating nonesterified fatty acid level as a predictive risk factor for sudden death in the population." Circulation **104**(7): 756-761.

Jovanovic, V. B., I. D. Pavicevic, M. M. Takic, A. Z. Penezic-Romanjuk, J. M. Acimovic and L. M. Mandic (2014). "The influence of fatty acids on determination of human serum albumin thiol group." Anal Biochem **448**: 50-57.

Jovanovic, V. B., A. Z. Penezic-Romanjuk, I. D. Pavicevic, J. M. Acimovic and L. M. Mandic (2013). "Improving the reliability of human serum albumin-thiol group determination." Anal Biochem **439**(1): 17-22.

Kato, M., H. Nakayama, Z. Makita, S. Aoki, Y. Kuroda, K. Misawa, H. Yoshida, K. Yanagisawa and S. Nakagawa (1989). "Radioimmunoassay for non-enzymatically glycosylated serum proteins." Horm Metab Res **21**(5): 245-248.

Keire, D. A., S. V. Mariappan, J. Peng and D. L. Rabenstein (1993). "Nuclear magnetic resonance studies of the binding of captopril and penicillamine by serum albumin." Biochem Pharmacol **46**(6): 1059-1069.

Komsta, L. (2009). "A comparative study on several algorithms for denoising of thin layer densitograms." Anal Chim Acta **641**(1-2): 52-58.

Kostolanska, J., V. Jakus and L. Barak (2009). "HbA1c and serum levels of advanced glycation and oxidation protein products in poorly and well controlled children and adolescents with type 1 diabetes mellitus." J Pediatr Endocrinol Metab **22**(5): 433-442.

Kragh-Hansen, U. (2013). "Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin-ligand complexes." Biochim Biophys Acta **1830**(12): 5535-5544.

Kragh-Hansen, U., V. T. Chuang and M. Otagiri (2002). "Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin." Biol Pharm Bull **25**(6): 695-704.

Kragh-Hansen, U., L. Minchiotti, A. Coletta, K. Bienk, M. Galliano, B. Schiott, Y. Iwao, Y. Ishima and M. Otagiri (2016). "Mutants and molecular dockings reveal that the primary L-thyroxine binding site in human serum albumin is not the one which can cause familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia." Biochim Biophys Acta **1860**(4): 648-660.

Lapolla, A., R. Flamini, A. Dalla Vedova, A. Senesi, R. Reitano, D. Fedele, E. Basso, R. Seraglia and P. Traldi (2003). "Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method." Clin Chem Lab Med **41**(9): 1166-1173.

Larsen, M. T., M. Kuhlmann, M. L. Hvam and K. A. Howard (2016). "Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease." Mol Cell Ther **4**: 3.

- Laurell, S. and G. Tibbling (1967). "Colorimetric micro-determination of free fatty acids in plasma." Clin Chim Acta **16**(1): 57-62.
- Lee, E., J. E. Eom, K. H. Jeon, T. H. Kim, E. Kim, G. J. Jhon and Y. Kwon (2014). "Evaluation of albumin structural modifications through cobalt-albumin binding (CAB) assay." J Pharm Biomed Anal **91**: 17-23.
- Lee, J. Y. and M. Hirose (1992). "Partially folded state of the disulfide-reduced form of human serum albumin as an intermediate for reversible denaturation." J Biol Chem **267**(21): 14753-14758.
- Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel and E. R. Stadtman (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **186**: 464-478.
- Lo, T. W., M. E. Westwood, A. C. McLellan, T. Selwood and P. J. Thornalley (1994). "Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin." J Biol Chem **269**(51): 32299-32305.
- Lu, J., E. Randell, Y. Han, K. Adeli, J. Krahn and Q. H. Meng (2011). "Increased plasma methylglyoxal level, inflammation, and vascular endothelial dysfunction in diabetic nephropathy." Clin Biochem **44**(4): 307-311.
- Lu, J., A. J. Stewart, P. J. Sadler, T. J. Pinheiro and C. A. Blindauer (2012). "Allosteric inhibition of cobalt binding to albumin by fatty acids: implications for the detection of myocardial ischemia." J Med Chem **55**(9): 4425-4430.
- Maher, P., R. Dargusch, J. L. Ehren, S. Okada, K. Sharma and D. Schubert (2011). "Fisetin lowers methylglyoxal dependent protein glycation and limits the complications of diabetes." PLoS One **6**(6): e21226.
- Malik, N. A., G. Otiko and P. J. Sadler (1980). "Control of intra- and extra-cellular sulphhydryl-disulphide balances with gold phosphine drugs: 31P nuclear magnetic resonance studies of human blood." J Inorg Biochem **12**(4): 317-322.

Mera, K., K. Takeo, M. Izumi, T. Maruyama, R. Nagai and M. Otagiri (2010). "Effect of reactive-aldehydes on the modification and dysfunction of human serum albumin." J Pharm Sci **99**(3): 1614-1625.

Merlot, A. M., D. S. Kalinowski and D. R. Richardson (2014). "Unraveling the mysteries of serum albumin-more than just a serum protein." Front Physiol **5**: 299.

Mesquita, C. S., R. Oliveira, F. Bento, D. Geraldo, J. V. Rodrigues and J. C. Marcos (2014). "Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins." Anal Biochem **458**: 69-71.

Mohebi-Nejad, A. and B. Bikdeli (2014). "Omega-3 supplements and cardiovascular diseases." Tanaffos **13**(1): 6-14.

Moriyama, Y., D. Ohta, K. Hachiya, Y. Mitsui and K. Takeda (1996). "Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: a comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins." J Protein Chem **15**(3): 265-272.

Odani, H., T. Shinzato, Y. Matsumoto, J. Usami and K. Maeda (1999). "Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction." Biochem Biophys Res Commun **256**(1): 89-93.

Ogasawara, Y., Y. Mukai, T. Togawa, T. Suzuki, S. Tanabe and K. Ishii (2007). "Determination of plasma thiol bound to albumin using affinity chromatography and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: ratio of cysteinyl albumin as a possible biomarker of oxidative stress." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **845**(1): 157-163.

Oliver, M. F. (2001). "Prevention of ventricular fibrillation during acute myocardial ischemia: control of free fatty acids." J Cardiovasc Pharmacol Ther **6**(3): 213-217.

Oliver, M. F. and L. H. Opie (1994). "Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias." Lancet **343**(8890): 155-158.

Olivieri, J. R. and A. F. Craievich (1995). "The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering." Eur Biophys J **24**(2): 77-84.

Ottnad, E., D. P. Via, J. Frubis, H. Sinn, E. Friedrich, R. Ziegler and H. A. Dresel (1992). "Differentiation of binding sites on reconstituted hepatic scavenger receptors using oxidized low-density lipoprotein." Biochem J **281** (Pt 3): 745-751.

Paschos, P. and K. Paletas (2009). "Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome." Hippokratia **13**(1): 9-19.

Peters, T. (1996). All about albumin : biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego, Calif. ; London, Academic Press.

Petitpas, I., T. Grune, A. A. Bhattacharya and S. Curry (2001). "Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids." J Mol Biol **314**(5): 955-960.

Phillips, S. A. and P. J. Thornalley (1993). "The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal." Eur J Biochem **212**(1): 101-105.

Poynton, C. A. (1998). Rehabilitation of gamma.

Reed, R. G. (1986). "Location of long chain fatty acid-binding sites of bovine serum albumin by affinity labeling." J Biol Chem **261**(33): 15619-15624.

Richieri, G. V., A. Anel and A. M. Kleinfeld (1993). "Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB." Biochemistry **32**(29): 7574-7580.

Richieri, G. V. and A. M. Kleinfeld (1995). "Unbound free fatty acid levels in human serum." J Lipid Res **36**(2): 229-240.

Roberts, J. R., J. Xiao, B. Schliesman, D. J. Parsons and C. F. Shaw, 3rd (1996). "Kinetics and Mechanism of the Reaction between Serum Albumin and Auranofin (and Its Isopropyl Analogue) in Vitro." Inorg Chem **35**(2): 424-433.

Roden, M., H. Stingl, V. Chandramouli, W. C. Schumann, A. Hofer, B. R. Landau, P. Nowotny, W. Waldhausl and G. I. Shulman (2000). "Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans." Diabetes **49**(5): 701-707.

Rodrigues, T., P. Matafome, J. Sereno, J. Almeida, J. Castelhana, L. Gamas, C. Neves, S. Goncalves, C. Carvalho, A. Arslanagic, E. Wilcken, R. Fonseca, I. Simoes, S. V. Conde, M. Castelo-Branco and R. Seica (2017). "Methylglyoxal-induced glycation changes adipose tissue vascular architecture, flow and expansion, leading to insulin resistance." Sci Rep **7**(1): 1698.

Rogiers, V. (1981). "Long chain nonesterified fatty acid patterns in plasma of healthy children and young adults in relation to age and sex." J Lipid Res **22**(1): 1-6.

Rondeau, P. and E. Bourdon (2011). "The glycation of albumin: structural and functional impacts." Biochimie **93**(4): 645-658.

Roopenian, D. C. and S. Akilesh (2007). "FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age." Nat Rev Immunol **7**(9): 715-725.

Ross, S. A., C. A. Carr, J. W. Briet and G. Lowe (2000). "Transfer of 4'-chloro-2,2':6',2"-terpyridine platinum(II) between human serum albumin, glutathione and other thiolate ligands. A possible selective natural transport mechanism for the delivery of platinum(II) drugs to tumour cells." Anticancer Drug Des **15**(6): 431-439.

Saad, B., W. T. Wai, B. P. Lim and M. I. Saleh (2007). "Flow injection determination of anisidine value in palm oil samples using a triiodide potentiometric detector." Anal Chim Acta **591**(2): 248-254.

Schnitzer, J. E. (1993). "Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability." Trends Cardiovasc Med **3**(4): 124-130.

Schnitzer, J. E. and J. Bravo (1993). "High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors." J Biol Chem **268**(10): 7562-7570.

Schnitzer, J. E. and P. Oh (1992). "Antibodies to SPARC inhibit albumin binding to SPARC, gp60, and microvascular endothelium." Am J Physiol **263**(6 Pt 2): H1872-1879.

Schnitzer, J. E. and P. Oh (1994). "Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins." J Biol Chem **269**(8): 6072-6082.

Schnitzer, J. E., A. Sung, R. Horvat and J. Bravo (1992). "Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism." J Biol Chem **267**(34): 24544-24553.

Simard, J. R., P. A. Zunszain, J. A. Hamilton and S. Curry (2006). "Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis." J Mol Biol **361**(2): 336-351.

Sleep, D. (2015). "Albumin and its application in drug delivery." Expert Opin Drug Deliv **12**(5): 793-812.

Smith, P. R. and P. J. Thornalley (1992). "Mechanism of the degradation of non-enzymatically glycosylated proteins under physiological conditions. Studies with the model fructosamine, N epsilon-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)hippuryl-lysine." Eur J Biochem **210**(3): 729-739.

Smith, S. R. and P. W. Wilson (2006). "Free fatty acids and atherosclerosis--guilty or innocent?" J Clin Endocrinol Metab **91**(7): 2506-2508.

Smith, S. W. (1975). "A new salting-out technique for colorimetric free fatty acid assays." Anal Biochem **67**(2): 531-539.

Smith, T. K. (2003). "Analysis of FFA in edible oils by catalyzed end-point thermometric titrimetry (CETT)." Journal of the American Oil Chemists' Society **80**(1): 21-24.

Sousa Silva, M., R. A. Gomes, A. E. Ferreira, A. Ponces Freire and C. Cordeiro (2013). "The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond." Biochem J **453**(1): 1-15.

Staehr, P., O. Hother-Nielsen, B. R. Landau, V. Chandramouli, J. J. Holst and H. Beck-Nielsen (2003). "Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis." Diabetes **52**(2): 260-267.

Stamler, J. S., O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keane, J. Vita, D. Singel, C. R. Valeri and J. Loscalzo (1992). "Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7674-7677.

Stewart, A. J., C. A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, D. Tooth and P. J. Sadler (2005). "Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin." FEBS J **272**(2): 353-362.

Stoscheck, C. M. (1990). "Quantitation of protein." Methods Enzymol **182**: 50-68.

Sudlow, G., D. J. Birkett and D. N. Wade (1975). "The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin." Mol Pharmacol **11**(6): 824-832.

Sugio, S., A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda and K. Kobayashi (1999). "Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution." Protein Eng **12**(6): 439-446.

Takabayashi, K., T. Imada, Y. Saito and Y. Inada (1983). "Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin." Eur J Biochem **136**(2): 291-295.

Team, R. C. (2015). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.

Thornalley, P. J., A. Langborg and H. S. Minhas (1999). "Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose." Biochem J **344 Pt 1**: 109-116.

Tinnikov, A. A. and R. Boonstra (1999). "Colorimetric micro-determination of free fatty acids in plasma using microplate readers." Clin Chim Acta **281(1-2)**: 159-162.

Torres, M. J., L. Turell, H. Botti, L. Antmann, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, R. Radi and B. Alvarez (2012). "Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids." Arch Biochem Biophys **521(1-2)**: 102-110.

Turell, L., H. Botti, S. Carballal, R. Radi and B. Alvarez (2009). "Sulfenic acid--a key intermediate in albumin thiol oxidation." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **877(28)**: 3384-3392.

Turell, L., R. Radi and B. Alvarez (2013). "The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes." Free Radic Biol Med **65**: 244-253.

Turk, Z., R. Mesic and B. Benko (1998). "Comparison of advanced glycation endproducts on haemoglobin (Hb-AGE) and haemoglobin A1c for the assessment of diabetic control." Clin Chim Acta **277(2)**: 159-170.

van der Vusse, G. J. (2009). "Albumin as fatty acid transporter." Drug Metab Pharmacokinet **24(4)**: 300-307.

van der Vusse, G. J., M. van Bilsen and J. F. Glatz (2000). "Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease." Cardiovasc Res **45(2)**: 279-293.

Weitz, D., H. Weintraub, E. Fisher and A. Z. Schwartzbard (2010). "Fish oil for the treatment of cardiovascular disease." Cardiol Rev **18(5)**: 258-263.

Westwood, M. E., O. K. Argirov, E. A. Abordo and P. J. Thornalley (1997). "Methylglyoxal-modified arginine residues--a signal for receptor-mediated endocytosis and degradation of proteins by monocytic THP-1 cells." Biochim Biophys Acta **1356(1)**: 84-94.

- Wong, H. and M. C. Schotz (2002). "The lipase gene family." J Lipid Res **43**(7): 993-999.
- Wu, D., X. Chen, P. Shi, S. Wang, F. Feng and Y. He (2009). "Determination of alpha-linolenic acid and linoleic acid in edible oils using near-infrared spectroscopy improved by wavelet transform and uninformative variable elimination." Anal Chim Acta **634**(2): 166-171.
- Wu, X. and V. M. Monnier (2003). "Enzymatic deglycation of proteins." Arch Biochem Biophys **419**(1): 16-24.
- Yamasaki, K., T. Maruyama, U. Kragh-Hansen and M. Otagiri (1996). "Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site." Biochim Biophys Acta **1295**(2): 147-157.
- Yasutake, A., K. Hirayama and M. Inoue (1990). "Interaction of methylmercury compounds with albumin." Arch Toxicol **64**(8): 639-643.
- Yoshida, S. (2008). "Analysis of fatty acid compositions of human tissues using Fourier-transform infrared spectroscopy." Lipid Technology **20**(8): 184-186.
- Zeng, J. and M. J. Davies (2006). "Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions." Chem Res Toxicol **19**(12): 1668-1676.
- Zhang, H., Y. Yang and U. P. Steinbrecher (1993). "Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages." J Biol Chem **268**(8): 5535-5542.
- Zhang, L. and X. Lin (2006). "Quantitative evaluation of thin-layer chromatography with image background estimation based on charge-coupled device imaging." J Chromatogr A **1109**(2): 273-278.
- Zhu, X., J. Peng, R. Raychowdhury, A. Nakajima, W. I. Lencer and R. S. Blumberg (2002). "The heavy chain of neonatal Fc receptor for IgG is sequestered in endoplasmic reticulum by forming oligomers in the absence of beta2-microglobulin association." Biochem J **367**(Pt 3): 703-714.

Zunszain, P. A., J. Ghuman, A. F. McDonagh and S. Curry (2008). "Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha." J Mol Biol **381**(2): 394-406.

Biografija autora

Ivan D. Pavićević rođen je 20. aprila 1984. godine u Kruševcu. Odrastao je u Varvarinu gde je završio osnovnu i srednju školu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu završio je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,56 i ocenom 10 na diplomskom radu i stekao zvanje diplomirani biohemičar. Tokom poslediplomskog akademskog puta završio je program Master biohemičar tokom školske 2010/2011. godine. Doktorske studije biohemije upisao je 2011. godine pod mentorstvom prof. dr Ljube Mandić na studijskom programu Doktor biohemijskih nauka, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Tokom doktorskih studija držao je vežbe studentima hemije na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od 2016. godine zaposlen je u Gradskom zavodu za javno zdravlje, Beograd, kao analitičar u laboratoriji za analizu namirnica.

Autor je osam naučnih radova u časopisima kategorije M21 i M22, od toga prvi autor na dva rada objavljena u časopisima kategorije M21, i osam saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.

Član je Srpskog hemijskog društva od 2005. godine, Srpskog biohemijskog društva i Udruženja toksikologa Srbije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Иван Д. Павићевић

Број индекса ДБ21/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Промене реактивности тиолне групе Cys34 хуманог серум-албумина
при везивању масних киселина *in vitro* и у карбонилном стресу

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 28.07.2017.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Иван Д. Павићевић

Број индекса ДБ21/2011

Студијски програм доктор биохемијских наука

Наслов рада Промене реактивности тиолне групе Cys34 хуманог серум-
албумина при везивању масних киселина *in vitro* и у карбонилном стресу

Ментор проф. др Љуба Мандић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 28.07.2017.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Промене реактивности тиолне групе Cys34 хуманог серум-албумина при
везивању масних киселина *in vitro* и у карбонилном стресу

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 28.07.2017.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M21)

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

Saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

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

Saopštenja na skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

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

Ostali radovi

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